

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**



TESIS

**ACTIVIDAD INHIBITORIA IN VITRO SOBRE LA ENZIMA
TIROSINASA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE *Origanum vulgare L.***

PRESENTADO POR:

BR: KAREN DEL CASTILLO TTITO

**PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE
QUIMICO FARMACEUTICO**

ASESORA:

Dra. CARLA DEL CARPIO JIMENEZ

CUSCO – PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: “**ACTIVIDAD INHIBITORIA IN VITRO SOBRE LA ENZIMA TIROSINASA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare L.***”

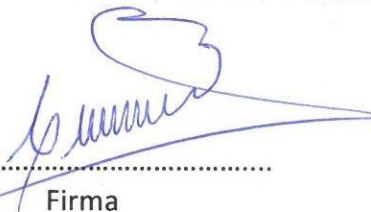
presentado por: KAREN DEL CASTILLO TTITO con DNI Nro :75404744; para optar al **título profesional /grado académico de QUIMICO FARMACEUTICO**. Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 02 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 9%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 ai 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 25 de JUNIO de 2024



Firma

Post firma: CARLA DEL CARPIO JIMÉNEZ

Nro. de DNI 23945000

ORCID del Asesor: 0000-0001-7487-354X

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:3 62535758

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis Final Karen del Castillo Ttito .pdf

AUTOR

Karen Del Castillo Ttito

RECUENTO DE PALABRAS

18655 Words

RECUENTO DE CARACTERES

108063 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

105 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.0MB

FECHA DE ENTREGA

Jun 22, 2024 10:09 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jun 22, 2024 10:10 PM GMT-5

● 9% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- **8% Base de datos de Internet**
- **Base de datos de Crossref**
- **4% Base de datos de trabajos entregados**
- **1% Base de datos de publicaciones**
- **Base de datos de contenido publicado de Crossref**

● Excluir del Reporte de Similitud

- **Material bibliográfico**
- **Coincidencia baja (menos de 12 palabras)**
- **Bloques de texto excluidos manualmente**
- **Material citado**
- **Fuentes excluidas manualmente**

AGRADECIMIENTO

A Dios quien me dio la vida y que, por guiar mis pasos, dar fortaleza y sabiduría para alcanzar nuestras metas a lo largo en este camino de la vida.

A mis padres que con sus esfuerzos me dieron la oportunidad de perseguir mis objetivos personales y profesionales por enseñarme a ser persona de bien.

A nuestra ilustre Universidad Nacional San Antonio Abad de Cusco, por ser parte de mi formación profesional y formarnos en conocimiento y sabiduría

A la Facultad de Ciencias de Salud, pero en gratitud a la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica por los docentes que me instruyeron para ser gran profesional del bien con vocación y ética.

Dra. Carla Del Carpio Jimenez por su consagración, preocupación, orientación, el tiempo y lo transmitido de su conocimiento a mi persona durante ese proceso como asesora.

A mi tía Luisa, a ti, mis amistades y personas que por compartir experiencias y/o de otra forma apoyaron en todo este proyecto de vida y siempre estuvieron conmigo.

Al laboratorio de Tecnología Farmacéutica y laboratorio de Química, por la ayuda para ejecutar este proyecto en sus instalaciones y equipamiento en el laboratorio.

A los miembros del jurado calificador por su tiempo, comprensión y sus eficaces sugerencias.

KAREN DCT.

INDICE

INDICE DE TABLAS	IV
INDICE DE FIGURAS	V
INDICE DE GRÁFICO.....	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
INTRODUCCIÓN	IX
CAPITULO I	1
105.1.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
105.2.FORMULACION DEL PROBLEMA	3
105.3.OBJETIVOS	3
105.3.1.OBJETIVOS GENERALES.....	3
105.3.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
105.4.LIMITACIONES	3
105.5.JUSTIFICACION	4
CAPITULO II	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1. RESEÑA HISTORICA.....	6
2.2. ANTECEDENTES	6
2.2.1 ANTECEDENTE INTERNACIONAL	6
2.2.2 ANTECEDENTE NACIONAL.....	9
2.3. BASES TEORICAS CIENTIFICAS.....	12
2.4. MARCO CONCEPTUAL	26

CAPITULO III	28
3.1. MATERIALES	28
3.2.1. Material botánico	28
3.2.2. Material de laboratorio	28
3.2.3. Equipos.....	28
3.2.4. Reactivos.....	29
3.2.5. Material de gabinete	29
3.2.6. Otros.....	29
3.2. DISEÑO METOLOGICO	30
3.2.1. TIPO DE DISEÑO INVESTIGACION.....	30
3.2.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN	30
3.3. DETERMINACIÓN DE VARIABLE.....	30
3.3.1. VARIABLE IMPLICADAS	30
3.3.2. VARIABLE NO IMPLICADAS	32
3.4. PRINCIPIO DE INCLUSION Y EXCLUSION.....	33
3.5. PROCEDIMIENTO	35
3.6. Metodología.....	36
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	45
3.8. Técnicas de análisis de datos estadísticos.....	45
CAPITULO IV	46
4.1. Identificación de componentes fitoquímicos del <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano).....	46
4.1.1. Determinación del porcentaje de rendimiento del extracto seco metanolico del <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano).....	46
4.1.2. Marcha fitoquímica	47
4.1.2. Determinación de la solubilidad del extracto	48

4.2. Determinación de la cantidad de fenoles totales por el procedimiento de Folin-Ciocalteu	49
4.2.1. De la curva de calibración	49
4.2.2. Resultado del contenido de polifenoles totales	51
4.3. Determinación de la capacidad antioxidante usando el procedimiento de decoloración DPPH.....	52
4.3.1. De la curva de calibración de Trolox	52
4.3.2. De la actividad antioxidante del extracto del metanólico de <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)	54
4.3.3. Significancia de la concentración de inhibición 50 (IC50)	57
4.4. Determinación de la actividad inhibitoria in vitro de la enzima tirosinasa .	58
4.4.1. Del patrón de ácido kójico	58
4.4.2. Extracto metanólico de <i>Origanum vulgare</i> L. y su actividad inhibitoria in vitro de la enzima tirosinasa	59
CONCLUSIONES.....	61
RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	62
Referencias Bibliográficas:.....	63
ANEXO	
.....	69

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. ORIGEN DEL OREGANO.....	6
TABLA 2.SUSTANCIAS DESPIGMENTANTES SINTÉTICOS ENCONTRADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERPIGMENTACIÓN CUTÁNEA	20
TABLA 3. RESUMEN DE VARIABLES IMPLICADAS	34
TABLA 4. ESTUDIOS DE IDENTIFICACIÓN FITOQUIMICA	38
TABLA 5.DIFERENTES DILUCIONES DE TROLOX	41
TABLA 6: PREPARACIÓN DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO KÓJICO 10mM	43
TABLA 7: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL EXTRACTO DE <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)	43
TABLA 8: PREPARACIÓN EN LOS POCILLOS PARA EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO	44
TABLA 9.RESULTADO DEL PORCENTAJE DE RENDIMEINTO DEK EXTRACTO DE ORIGANUM VULGARE L (OREGANO).....	46
TABLA 10.MARCHA FITOQUIMICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE ORIGANUM VULGARE L. (ORÉGANO)	47
TABLA 11. RESULTADOS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO	48
TABLA 12. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO DE CONCENTRACIÓN CON ABSORBANCIA.....	49
TABLA 13.CONTENIDO DE POLIFENOLES EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE ORIGANUM VULGAE L.....	51
TABLA 14. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL PATRÓN DE TROLOX CONCENTRACIÓN CON ABSORBANCIA	52
TABLA 15.CURVA DE CALIBRACIÓN DEL TROLOX	53
TABLA 16. ABSORBANCIAS DEL EXTRACTO METANÓLICO EN EL ENSAYO DPPH	54
TABLA 17.RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO	55
TABLA 18.PREPARACION DEL ÁCIDO KÓJICO 10 mM A DIFERENTES CONCENTRACIÓN	58
TABLA 19.CORRELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON ABSORBANCIA DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	59
TABLA 20.RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	60

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1: ORIGANUN VULGARE L. (OREGANO)	13
FIGURA N° 2: ENZIMA TIROSINASA.....	15
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA PIEL Y SUS PARTES.....	16
<i>FIGURA 4. REACCIÓN QUÍMICA DEL PROCESO DE LA MELANINA EMPEZANDO DE LA FENILALANINA, PROCEDENTE POR LA TIROSINA</i>	<i>18</i>
FIGURA 5. FUNDAMENTO DEL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU	24
FIGURA 6. UBICACION GEOGRAFICA DE LA COMUNIDAD DE HANCCOHOCCA-CUSCO.....	36

INDICE DE GRÁFICO

GRÁFICO 1. CURVA DE CALIBRACIÓN USANDO ÁCIDO GÁLICO PARA DETERMINAR POLIFENOLES TOTALES.....	50
GRÁFICO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	53
GRÁFICO 3. RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO	56
GRÁFICO 4. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 DEL EXTRACTO METANÓLICO DE ORIGANUM VULGARE L. (ORÉGANO).....	57

RESUMEN

El *Origanum vulgare* L. (Orégano) pertenece a la familia Lamiaceae, actualmente es parte de muchos remedios herbales, y ofrece aún posibilidades de investigación por lo que la elegimos para estudiar su actividad como inhibidor de la tirosinasa, enzima involucrada en el proceso de hiperpigmentación de la piel, que constituye un problema estético muy incómodo para aquellas personas que tienen manchas especialmente en el rostro, lo que los lleva a tener problemas de autoestima y que repercute en su vida social, por lo que surge la necesidad de buscar nuevas fuentes naturales de despigmentantes, especialmente aquellos cuyo efecto se desarrolla por inhibición de la enzima tirosinasa.

El objetivo de la presente investigación es determinar la actividad inhibitoria in vitro de la enzima tirosinasa y la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano). El extracto se obtuvo por maceración de las hojas y tallos de la planta en metanol, se realizó la marcha fitoquímica, encontrándose presencia de compuestos polifenólicos que fueron cuantificados usando el método de Folin Ciocalteu; se determinó la solubilidad del extracto en solventes con diferente polaridad. Para el estudio de la actividad antioxidante se usó el método DPPH (difenil 2 picrilhidrazilo). Entre los principales resultados podemos mencionar la presencia de compuestos fenólicos en gran cantidad y al cuantificarlos se obtuvo 71.37 µg/mL. La solubilidad fue mayor en solventes polares. La actividad antioxidante mostró un IC₅₀ de 310 µg/mL, y como patrón se usó Trolox.

Finalmente se determinó la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa usando como estándar el ácido kójico 10mM y se determinó el porcentaje de inhibición por el método de espectrofotometría mostrando un valor de IC₅₀ de 351.43 µg/mL.

Se concluye que la presente investigación nos da a conocer científicamente que el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) presenta actividad antioxidante y actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa.

Palabras clave: Antioxidantes, enzima tirosinasa, polifenoles totales, *Origanum vulgare* L. (Orégano), método DPPH.

ABSTRACT

Origanum vulgare L. (Oregano) belongs to the Lamiaceae family, and it is currently part of many herbal remedies, offering potential for further research. We chose it to study its activity as a tyrosinase inhibitor, an enzyme involved in the skin hyperpigmentation process, which is a significant aesthetic concern for individuals with facial blemishes. These blemishes can lead to self-esteem issues and social consequences, prompting the need to explore new natural sources of depigmenting agents, especially those that work through tyrosinase inhibition.

The objective of this research is to determine the *in vitro* inhibitory activity of the tyrosinase enzyme and the antioxidant activity of the methanolic extract of *Origanum vulgare* L. (Oregano). The extract was obtained by macerating the leaves and stems of the plant in methanol, and phytochemical analysis was conducted, revealing the presence of polyphenolic compounds quantified using the Folin Ciocalteu method. The extract's solubility in solvents with different polarities was determined. The DPPH method (diphenyl 2 picrylhydrazyl) was employed to study antioxidant activity, resulting in an IC₅₀ of 310 µg/mL, using Trolox as a standard.

Furthermore, the inhibitory activity of the tyrosinase enzyme was determined, with 10mM kojic acid as the standard. The percentage of inhibition was measured using spectrophotometry, yielding an IC₅₀ value of 351.43 µg/mL.

In conclusion, this research scientifically demonstrates that the methanolic extract of *Origanum vulgare* L. (Oregano) exhibits antioxidant activity and inhibitory activity against the tyrosinase enzyme.

Keywords: Antioxidants, tyrosinase enzyme, total polyphenols, *Origanum vulgare* L. (Oregano), DPPH method.

ABREVIATURAS

ABTS:	Ácido 2,2 azinobis-3 etilbenzotiazolina - 6 sulfónico
IC 50:	Concentración inhibitoria 50
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPPH:	Radical 1,1 difenil 2 picrilhidrazilo
FRAP:	Ferric reducing antioxidant power
g:	Gramo
L-DOPA:	la levodopa
mL:	Mililitros
µL:	Microlitros
TROLOX:	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-Tetrametilcromano 2-carboxílico
P/V:	Porcentaje de peso a volumen
UV:	Luz Ultravioleta

INTRODUCCION

El Perú es un país extraordinario con una enorme biodiversidad y con una noble tradición de uso de plantas medicinales con fines curativos por lo que muchas plantas forman parte de la historia ancestral, por lo que a través de los años ha proporcionado recursos de gran utilidad para el tratamiento de diversas patologías y dolencias de las personas. (1)

Origanum vulgare L (Orégano) es una especie vegetal perteneciente a la familia Lamiaceae con amplia distribución en el Perú. Sus hojas son utilizadas como remedios herbales por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, para tratamiento de desórdenes menstruales, enfermedades respiratorias, diabetes, antipiréticas y antiespasmódicas. Las hojas, raíces y partes aéreas de esta planta presentan: aceites esenciales, decena de iridoides, dos flavononas (pinocembrina y naringenina) y una naftoquinona (lapachenol). Por su alta capacidad antioxidante el *Origanum vulgare L.* (Oregano) es usado como reemplazo de los antioxidantes sintéticos. (2,3)

La enzima tirosinasa presenta diferentes usos en la agricultura, medicina, cosmética y en la industria alimentaria. La tirosina desempeña un papel importante en la producción de la melanina esto se debe a que regula su producción. (4) y las manchas que aparecen en el rostro y cuello de las personas se debe precisamente a su alta producción, por ello es necesario contar con activos que regulen su producción, siendo los más útiles los inhibidores de la tirosinasa.

Los antioxidantes o la capacidad antioxidante contenida en un producto han tomado importancia a nivel de la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Entre los antioxidantes naturales se encuentran los polifenoles presentes en distintas partes de las plantas en donde cumplen funciones como defensa contra las plagas, la radiación solar y algunas enfermedades. (3,5)

Para la evaluación de la actividad antioxidante existen distintos procedimientos, destacando el método DPPH, que es un método que determina la actividad antioxidante cuyo fundamento se basa en la aceptación de un electrón por la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazina, al reaccionar con un sustrato antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno, donde se observa la decoloración de la solución violácea para convertirse en una solución amarilla, producto de la reducción del radical libre por el antioxidante. (6)

Teniendo en cuenta la necesidad de buscar despigmentantes naturales, en esta investigación se desea evaluar la actividad antitirosinasa y la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare L* (Orégano) esperando con ello dar un aporte significativo a futuras investigaciones. (1,5)

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud indica que las poblaciones en el mundo utilizan extractos de diferentes plantas para cuidar y recuperar su salud, por ello el uso de la medicina tradicional debe tener prioridad y demostrar su utilidad a través de la investigación científica, teniendo en cuenta que no presentan riesgos elevados para la salud. Dentro del gran abanico de las plantas medicinales se encuentran las plantas aromáticas que presentan propiedades culinarias y condimentarias que son utilizadas en la industria farmacéutica, licorería, perfumería, entre otras. (7)

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que inhiben eficazmente las especies reactivas del oxígeno (ROS), manifiestan una importante actividad antimicrobiana y se presume que participan en la protección de las células contra las radiaciones UV nocivas. (8,9) Las propiedades antioxidantes de los polifenoles se derivan de su alta reactividad como donantes de hidrógeno o electrones, de la capacidad del radical derivado del polifenol para estabilizar y deslocalizar el electrón no apareado y de su capacidad para quelar iones. (9) Asimismo, debido a su parecido estructural con la L-DOPA y la tirosina (los sustratos naturales de la tirosinasa), los compuestos fenólicos vegetales podrían bloquear eficazmente la síntesis de melanina, lo que los convierte en atractivos agentes despigmentantes. (10) Así, y considerando que la síntesis de melanina puede controlarse mediante la inhibición de la actividad de la tirosinasa, los inhibidores de la tirosinasa pueden ser cosmética y clínicamente útiles para el tratamiento del cáncer de piel y algunos trastornos dermatológicos asociados a la hiperpigmentación por melanina. (11)

El orégano es una de las plantas aromáticas más usadas en el mundo y cultivada por siglos, descubierta por nuestros antepasados y usado con el fin de saborizar las comidas y para darle al medio ambiente un olor agradable; es una planta herbácea y perenne que ha demostrado propiedades culinarias, medicinales, actividad analgésica, antiinflamatoria, antiespasmódica, para enfermedades respiratorias, antioxidante y antimicrobiana, siendo las actividades antimicrobiana y antioxidante

las más destacadas. (5) Contiene compuestos fitoquímicos como flavonoides, polifenoles, taninos, ácidos fenólicos y aceites esenciales (timol, origaneno, carvacrol) responsables de sus propiedades medicinales. (12) Su actividad antioxidante se debe a la presencia de polifenoles, que son los compuestos fitoquímicos de mayor presencia, gracias a la actividad que tienen de captar radicales libres por lo que es muy útil como alternativa terapéutica, nutracéutica y cosmética. (5) Teniendo en cuenta que el orégano es una planta con fuerte composición en compuestos fenólicos es posible que sus extractos polares (metanólicos, etanólicos entre otros) presenten actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa y se pueda convertir en una potencial fuente de activos despigmentantes, así como de activos antioxidantes. (12)

La piel es el órgano del cuerpo humano más visible y su cuidado es muy significativo para las personas, por lo que la pigmentación cutánea y especialmente del rostro llega a ser un problema estético y psicológico, por esta razón hay mucho interés en la búsqueda de compuestos de origen natural con poder aclarador de la piel pigmentada debido a causas internas o externas como las hormonas, o el envejecimiento debido a la radiación solar. La hiperpigmentación se produce a causa de la producción excesiva de la enzima tirosinasa, quien se encarga de la conversión de fenilalanina en L-dopa y dopaquinona teniendo como cofactor al cobre, el cual es el precursor de la pigmentación de la tonalidad de la piel. (2)

Existen compuestos de origen sintético que son incorporados en la formulación de cosméticos por sus propiedades despigmentantes: arbutina, hidroquinona y el ácido Kójico, pero muchos de estos compuestos son altamente reactivos y presentan mutagenicidad; su uso prolongado produce la despigmentación permanente y hepatotoxicidad, por lo que existe la necesidad de investigar otros compuestos de origen natural. (1)

En este trabajo se pretende evaluar la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa y la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L “Orégano” con el fin de evidenciar sus posibles aplicaciones cosméticas y su utilización en la formulación de fitocosméticos. (13)

1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA

¿El extracto metanólico de *Origanum vulgare* L “Orégano” presentará actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa y actividad antioxidante usando el método DPPH y el contenido de polifenoles usando ensayo de Folin-Ciocalteu?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVOS GENERALES

Determinar la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa y la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).

1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtener el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) e identificar los metabolitos secundarios presentes en dicho extracto.
2. Determinar mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu el contenido de fenoles totales presentes en el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).
3. Evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) usando el método de decoloración DPPH.
4. Determinar la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).

1.4. LIMITACIONES

No se encontró suficiente material bibliográfico sobre la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa de la especie en estudio *Origanum vulgare* L. (Orégano)

1.5. JUSTIFICACION

De conocimiento

En los últimos años, las actividades biológicas del aceite esencial del *Origanum vulgare* L. se han estudiado intensamente, sin embargo, los extractos de orégano están menos estudiados que los aceites esenciales. (14)

En ese sentido la presente investigación pretende generar conocimiento sobre la actividad antioxidante y despigmentante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* teniendo en cuenta que este solvente es capaz de extraer compuestos fenólicos de manera eficiente, de esta manera generar información para otros investigadores interesados en el estudio fitoquímico o farmacológico de los extractos de esta planta.

De prioridad

Las alteraciones de la melanogénesis pueden ser muy perjudiciales y conducir al melanoma maligno, un cáncer de piel con una incidencia cada vez mayor. (15) Así, y considerando que la síntesis de melanina puede controlarse mediante la inhibición de la actividad de la tirosinasa, los inhibidores de la tirosinasa pueden ser cosmética y clínicamente útiles para el tratamiento del cáncer de piel y algunos trastornos dermatológicos asociados a la hiperpigmentación por melanina. Por todas estas razones, la búsqueda de agentes antioxidantes y antitirosinasa son objetivos valiosos que están ganando atención en la investigación de plantas medicinales. Esta necesidad es crucial y urgente, ya que muchos agentes comerciales antitirosinasa conocidos adolecen de graves desventajas como una elevada citotoxicidad, un poder de penetración insuficiente y una baja estabilidad. (16) Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos inhibidores de la tirosinasa que sean viables, seguros y eficientes es fundamental.

De aplicabilidad

Este trabajo de investigación brinda información valiosa sobre los extractos metanólicos de *Origanum vulgare*, poniendo a disposición de los investigadores las dosis a las que éste presenta actividad antioxidante y despigmentante por inhibición de la enzima tirosinasa, así como la metodología usada para evaluar ambas actividades.

Social

Los trastornos hiperpigmentarios de la piel, como el melasma, las pecas y la hiperpigmentación postinflamatoria, se caracterizan por la sobreproducción y acumulación de melanina, y pueden tener repercusiones negativas en el estado psicosocial de los sujetos, ya que son frecuentes en las zonas expuestas de la cara y el cuello, aunque existen tratamientos que usan activos sintéticos, éstos presentan muchas reacciones adversas y citotoxicidad, por ello es importante investigar fuentes naturales de activos naturales que sean accesibles y seguros, en ese sentido, el Orégano es una especie vegetal con potencial uso en la cosmética natural por haber demostrado en este estudio su actividad despigmentante y antioxidante.(1)

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. RESEÑA HISTORICA

TABLA 1. ORIGEN DEL OREGANO

Se cultivó inicialmente en Grecia	Fue utilizado por primera vez por los griegos, por eso se dice que es el lugar de origen del orégano
Durante la Edad Media	Se utilizó para tratar reumatismo, dolor de muelas, la indigestión, ataques de tos, síntomas de hígado y antiséptico del medio mientras había las epidemias
Siglo XV	Cambiado a América que, por tener adaptación al clima, fue integrada en condimentos en la fórmula ancestrales de los pueblos
Mediterráneo, California y México	Actualmente, su comercio se centra
Argentina y Perú	Son sembrados en inmensas tierras de cultivo para su utilización, producción y destinadas a la exportación

FUENTE: Yan A. Azizi, S (13)

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1 ANTECEDENTE INTERNACIONAL

Agustín G., Calderón A., Martínez C. y Ortiz J. (2015) Actividad Antitirosinasa de ocho especies de plantas nativas de Mesoamérica usadas en aplicación dérmica. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. (1)

Realizaron un estudio experimental con el **objetivo** de estandarizar los métodos para determinar la capacidad antitirosinasa de extractos vegetales diclorometánicos y metanólicos de las ocho especies de plantas nativas de Mesoamérica (*Lippia graveolans*, *Litsea guatemalensis*, *Dorstenia contrajerva*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Vernonia deppeana*, *Byrsonia crassifolia*, *Smilax domingensis*, *Gliricidia sepium*) y buscar agentes despigmentantes de la piel. **Método:** la evaluación realizada se hizo mediante dos pruebas: uno cualitativa que es por cromatografía en capa fina, y representado por alfa de 0.1 y beta en 0.5; el otro cuantitativo por espectrofotómetro con el nivel de confianza fue del 95% ($\alpha = 0.05$). En sus **resultados** en la prueba cualitativa de cromatografía de capa fina se utilizó como patrón de ácido kójico y 1,2 benzopirona presentando como positivo en lugares incoloros de gris purpura, con resultados de alfa 0.1; en los extractos diclorometánicos y metanólicos en donde se observó que no existe una buena separación de metabolitos presentando un RF que va desde 0.74 a 0.88 entre los extractos y con resultados obtenidos no son conclusivos para la actividad antitirosinasa: en la prueba cuantitativa de la actividad de la tirosina en espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm, con un patrón de ácido kójico con un coeficiente de determinación de r entre 0.9911 y para los extractos se realizó con una concentración de 2 mg/mL, se observa que la mayoría de los extractos no tienen capacidad de inhibir de 50% de la actividad enzimática pero dos extractos diclorometanico y metanólico de *D. contrajerva* y metanólico de *B. crassifolia*, *G. sepium* y *P. pseudoaureum* tiene actividad inhibitoria mayor al 50%. **Conclusión:** la metodología que presenta la investigación es alfa por 0.1 para la prueba cualitativa y alfa en 0.05 para la prueba cuantitativa de espectrofotómetro; cuando se realizó la prueba cualitativa no se determinó la actividad antitirosinasa de los extractos ensayados porque presentó pocos metabolitos secundarios; de los extractos ensayados no se tiene ninguna significancia en la actividad antitirosinasa con el patrón del ácido kojico, por lo que no es bueno en la dermatología como despigmentantes. (1)

Guevara G. (2018). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana “in vitro” del Extracto Hidroetanólico de Hojas de *Origanum majorana* en cepas de *Proteus* spp. Universidad Regional Autónoma de los Andes (UNIANDES) Facultad de Ciencias Médicas. (6)

Realizada con el **objetivo** de valorar la acción antimicrobiana “in vitro” del extracto hidroetanólico de las hojas de *Origanum majorana* sobre *Proteus* spp. **Método:** el presente informe tiene cuatro etapas: uno de ellos es de reconocimiento taxonómico para reconocer y escoger la planta con mejor utilización como agentes antimicrobianos; la otra etapa se realizó para verificar en el extracto hidroetanólico la presencia de metabolitos para su identificación, la otra etapa evaluó la fitoquímica del extracto y, por último, se determinó la actividad antimicrobiana del extracto hidroetanólico. **Resultados:** la cuantificación del aceite esencial por GC-MS evidenció la presencia de constituyentes de oxígeno siendo cuatro: alfa-terpineno en 28,96%, y terpineno en 18,57% y beta terpineno en 12,72%. Los hidrocarburos monoterpénicos son los mayoritarios con 51.7%, monoterpenos oxigenados con 44.38%, hidrocarburos sesquiterpénicos en 3.67% de todos los compuestos por detallar en 99.75%. **Conclusión:** por los resultados de la determinación fitoquímica hecha del extracto hidroetanólico de *Origanum majorana* se evidenció la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, azúcares, triterpenos y taninos; otorgándole la actividad antimicrobiana. (6)

Mantilla A.Y.A. (2018). Evaluación de la producción flavonoides a partir de orégano (*Origanum vulgare* L) por la técnica de suspensión celular. Universidad Santander Facultad de Ciencias Exactas, Físicas Naturales. Bucaramanga, Colombia. (17)

El **objetivo** fue determinar la productividad de flavonoides encontradas en el *Origanum vulgare* L. (Orégano) por el procedimiento de supresión celular de un biorreactor airlift. **Resultados:** la determinación de los flavonoides del extracto de *Origanum vulgare* L. se efectuó por el ensayo colorimétrico de Shinoda. Dado por Alcalis, Mg +HCL que se da para el reconocimiento de flavonoides evidenciado por el cambio de color como positivo la presencia de flavonoides. **Conclusión:** se

fabricó un modelo de biorreactor air-lift con sensores para la inspección del tiempo, pH, y con reglamentación de Oxígeno, en la producción de flavonoides en el *Origanum vulgare* L. (17)

Torrenegra A., Miladys E. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de orégano (*Oreganum vulgare*), orégano “borde blanco” (*Origanum vulgare ssp*) y oreganito (*Lippia alba*) cultivado en la zona Norte del departamento de Bolívar (Colombia). Universidad José Faustino Sánchez Carrión Facultad de Ingeniería Agraria, Industria Alimentaria y Ambiental. (18)

Objetivo: Determinar la composición química y la actividad antioxidante obtenidos de las especies vegetales de *Oreganum vulgare (ssp)* y *Lippia alba Mill* sembradas en el departamento de Bolívar (Colombia). **Método:** aceites esenciales son resultado de la hidrodestilación, la especie *Lippia alba* presentó un rendimiento con valores 0.1 - 0.15%, las otras especies vegetales presentaron rendimientos inferiores al 0.1% y los componentes fueron determinados por cromatografía de gases junto a espectrometría de masas; el compuesto encontrado es el carvacrol es de la especie orégano “borde blanco” (*Origanum vulgare ssp*) que se presenta en un 69.97%. La actividad antioxidante en los aceites esenciales fue determinada por los ensayos de DPPH, ABTS y ORAC, como resultado es que el aceite esencial de *Origanum vulgare ssp* presento la actividad antioxidante igual al del ácido ascórbico. **Resultado:** la actividad antioxidante fue determinada para el aceite esencial de *Origanum vulgare ssp*. (18)

2.2.2 ANTECEDENTE NACIONAL

Condo Y Quispe (2019) Efecto anti-tirosinasa de extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja). Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica Lima, Perú. (19)

Objetivo: valorar el efecto antitirosinasa de extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando en función de la enzima tirosinasa. **Método:** se realizó por cromatografía y espectrofotometría; la

determinación fitoquímica se usó los extractos metanólico y etil acetato a partir de maceración, evaporación y re-suspensión del epicarpio. **Resultados:** en la determinación fitoquímica se tuvo positivo para alcaloides, flavonoides, quinonas y polifenoles; se determinó cualitativamente la inhibición de la tirosinasa o actividad antitirosinasa mediante cromatografía en capa fina como patrón de ácido kójico de 0.05%, dando por aspersion de L-tirosina a 0,1mM y tirosinasa 1000 U/mL y como resultado manchas blancas en el fondo oscuro de la silica gel, para determinación del porcentaje de inhibición por el método espectrofotométrico se expresó en 44,3% metanólico y etil acetato se expresó 105,4% a una concentración de 5mg/mL y los resultados de IC50 para dichos extractos fueron 5,23 mg/mL; 1,54 mg/mL y el estándar de ácido kójico fue 0,023 mg/mL. **Conclusión:** los extractos etil acetato y metanólico del epicarpio de *Citrus sinensis* (L) han mostrado interesantes efectos antitirosinasa para la industria cosmética y en el tratamiento antimelanogénico. (19)

Mera S., Papuico S. (2020) Actividad Anti-tirosinasa y Efecto Fotoprotector del Extracto Etanólico del Tegumento de dos Variedades de *Phaseolus vulgaris* L. ñuña roja y negra Universidad Norbert Wiener facultad de farmacia y bioquímica Lima, Perú. (20)

Objetivo: determinar la actividad antitirosinasa y evaluación del efecto fotoprotector de dos tipos de extractos etanólicos del tejido de 2 tipos de diversidad de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” negra y roja. **Método:** la investigación se realizó en cromatografía de capa fina y con patrón de ácido Kójico en 0,05 %, para la actividad antitirosinasa; para el efecto fotoprotector se realizó un diseño complementario aleatorio con treinta y cinco ratones hembras de la especie *Mus musculus* de 7 semanas de edad, con 5 grupos de ensayo, se les rasuró la espalda y suministró una radiación ultravioleta por treinta minutos una vez al día por un mes, conjuntamente a ello se suministró el gel en distintas preparaciones: 2 y 5 % p/v. La escala de Draize se utilizó para evaluar el daño por luz aguda y medir el daño de irritación, y el daño de envejecimiento lumínico producido utilizando la escala Glogau. **Resultado:** presentaron compuestos fitoquímicos el extracto etanólico del tejido de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra; que no es tóxico en ratones puesto que la dosificación de 5000 mg/kg por vía oral y dérmica no produjo ninguna reacción

tóxica; presentando una capacidad anti-tirosinasa establecida por cromatografía en capa fina del gel al 5%; la variedad roja no presenta un resultado del efecto fotoprotector en ratones irradiados con luz UVC. **Conclusión** extracto etanólico del tejido de ñuña negra al cinco % en gel presenta una propiedad de fotoprotector. (20)

Contreras E., Alor R. (2019). Determinación de Capacidad Antioxidante y Fenoles Totales en Semillas de *Vitis Vinifera* L. “Vid”, del Valle de Cañete. Universidad José Faustino Sanchez Carrión Facultad de Ingeniería Agraria, Industria Alimentaria y Ambiental, Lima. (21)

Objetivo: evaluar la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles de las semillas de uvas más representativas del Valle de Cañete-Lima. **Método:** se trabajaron con 7 variedades de semillas de uvas: Quebrata, Uvina, Italia, Moscatel, Borgoña blanca, Borgoña negra y Red globe, se realizó el secado y molienda para su posterior fermentación para luego trabajar en 2 periodos por el método de la extracción: acetona-agua (70-30) y metanol-agua (1-1) pH 2.2 y se calculó la capacidad antioxidante por FRAP, ABTS y DPP. Para la evaluación de polifenoles totales por el ensayo de Folin-Ciocalteu; con una correlación existente por el coeficiente de correlación de Pearson, si existe relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales. **Resultado:** se determinó la actividad inhibitoria en la variedad Quebranta, dando negativo para la variedad Uvina y Italia, la diversidad de Borgoña negra, el ensayo de DPPH dio como resultado 181.08-53.46 uMol DPPH secuestrado/g de semillas y un IC50 entre 0.21 a 0.55 mg semillas/mL, en ABTS+ dio 1292.94 a 660.4 uMol es igual Trolox/g de semillas, en el ensayo FRAP dio 451.19 a 225.01 u Mol equivale Acido gálico/g de semillas y para determinar los polifenoles dio en Quebranda con mayor promedio y la Borgoña negra con el mínimo, obteniendo 97.26 a 63.23 mg igual Acido gálico/g de semillas. Existe una relación entre los ensayos de FRAP y polifenoles totales: 0.942; DPPH: 0.919; ABTS+: 0.890. **Conclusión:** las semillas de uvas del Valle de Cañete presentan una excelente actividad antioxidante. (21)

2.3. BASES TEORICAS CIENTIFICAS

ORIGEN DEL OREGANO (*Origanum vulgare* L.)

El orégano deriva del griego oros y gamos que significa alegría de la montaña, que representa felicidad esto es por su aspecto y por su aroma. El orégano tiene varias especies, con propiedades culinarias y medicinales. El *Origanum vulgare* es originario de Europa, y la *Lippia graveolens* es nativa de México. (22)

HABITAT Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA DEL OREGANO (*Origanum vulgare* L.)

Se desarrolla en pastizales, malezas, canteras, en sectores secos y calurosos, también lo encontramos en lugares arcillosos en donde hay presencia de compuestos nitrogenados. Se encuentra sobre el nivel del mar a los 1700 m y se desarrolla en luz, aunque soporta sombra. Se encuentra en mayor cantidad en Europa, el Mediterráneo, el Oriente Medio, Siberia, India, América del Norte y el Trópico. (23)

El orégano que se produce en el Perú se denomina comúnmente como "Zambito" y "Nigra", los cuáles son híbridos que provienen del cruce entre la mejorana (*Origanum majorana* L.) con las subespecies de *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* y *Origanum vulgare* L. subsp. *Virens*. (23)

En el sur del país, donde se siembra la mayor parte del orégano, hay diferencias entre el producto de la costa y de la sierra, siendo este último, el que accede a mejores precios, tiene menos problemas de residuos químicos de herbicidas, o plaguicidas. Este orégano denominado "orégano nigra" tiene características especiales respecto a las plantas convencionales comúnmente utilizados. Este tipo de orégano normalmente se siembra por encima de los 2 500 msnm. (24)

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL OREGANO (*Origanum vulgare* L.)

Es una planta herbácea, fragante y perdurable, repartida en todo el mundo, que puede alcanzar una altura de entre 40 a 80cm. Sus hojas son curvadas, pilosas, glandulosas y pecioladas son de color verde a verde grisáceo se dividen en superior y tienden a deshojarse en las partes más debajo. Las flores presentan espiga de verticilastros de 5-30 mm, son ovoides, presenta inflorescencia corimbosa, brácteas florales de 4-5 mm, diferentes a las hojas, son de color purpura violáceo. El cáliz presenta glándulas amarillas, es piloso, la corola es de 4-7 mm, es bilabiada, de color rojo-púrpura. Brota de julio a septiembre. (25)



FIGURA N°1: *ORIGANUM VULGARE* L. (OREGANO)

Fuente: Karen del Castillo

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Nombre Científico: *Origanum vulgare* L.

Nombre Común: Orégano

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Origanum*

Especie: *Vulgare* (26)

USOS EN MEDICINA TRADICIONAL

- Respiratorio: El orégano actúa como expectorante, efecto irritante e incrementa la secreción en el bronquio alveolar, está indicada para bronquitis, la tos no productiva, resfriado, tos seca o flema.
- Antiespasmódico: El orégano por presentar timol y carvacrol ejerce una acción de relax en el musculo liso.
- Digestivo: El orégano aumenta los jugos gastrointestinales, en dispepsias, cólicos.
- Antioxidante: el orégano por presentar 26 compuestos entre ellos los polifenoles en estudios realizados encontraron que hay una inhibición de la oxidación de las proteínas LDL e impedir afectar el ADN.
- Antimicrobiano: Por presencia carvacrol y timol, actúa contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*
- Antiinflamatorio: En los ensayos de extracto alcohólico es de inhibir la lipoxigenasa
- Antidiabético: Actúa como inhibición de la enzima aldosa reductasa, y descubierto en ensayos que se realizó en ratas diabéticas al suministrar por 15 días
- Disminución de orina, retención urinaria, acumulación de líquidos (26)

COMPUESTOS ACTIVOS DE OREGANO (*Origanum vulgare*)

- Presenta un aceite esencial que es de color amarillento, que contiene compuestos como el carvacrol, terpineol, linalol, timol, alfa y beta pinenos. Por ello se les confiere principalmente propiedades tónicas, antimicrobianas, antibacterianas y antifúngicas
- Ácidos fenólicos: cafeico, clorogénico, rosmarínico.
- Flavonoides: apigenol, luteolol, kempferol, diosmetol.
- Triterpenos como el ácido ursólico.
- Ácidos fenolcarboxílicos: cafeico, clorogénico y ácidos rosmarínico,
- Taninos.
- Principios amargos. (26)

LA ENZIMA TIROSINASA

La tirosinasa es una metaloenzima que se encarga de catalizar la producción de melanina. Está distribuida en bacterias, hongos y plantas en donde se encarguen de la producción de pigmentos de melanina. La tirosinasa es encargada del pardeamiento de las frutas y vegetales por las enzimas presentes y en los humanos la enzima es responsable de las anomalías en la pigmentación de la piel y en enfermedades como el Parkinson. (21)

La tirosinasa pertenece a la familia de las proteínas de cobre de tipo 3, con sitio activo de dos átomos de cobre de color verde y superficie molecular de color rojo como se observa en la figura N°2; es una enzima que se encarga de la oxidación de fenoles (por ejemplo, la tirosinasa). La síntesis de tirosinasa se da en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso, luego prosigue en el complejo de Golgi en donde termina la glicosilación de la tirosinasa unida a la asparagina para de su salida hacia los melanosomas. (19)

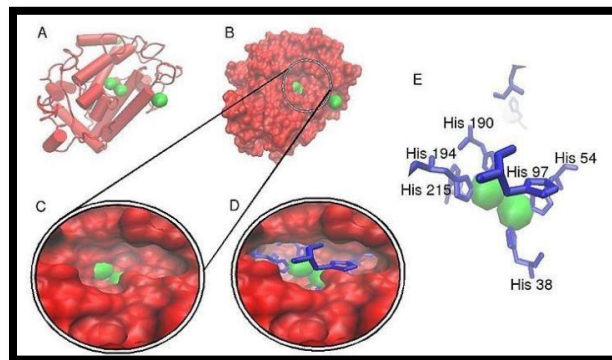


FIGURA N° 2: ENZIMA TIROSINASA

Fuente: Shabani. (27)

PROCESO DE LA MELANOGÉNESIS

La piel es un órgano que comprende en el humano, es una barrera protectora que separa del medio que rodea, cuidándola y protegiéndola de agentes extraños que le dañen, actúa también como comunicación con su entorno. Consta de 3 capas: (28)

- ❖ La epidermis: Está compuesta por queratinocitos y menor por melanocitos, encargadas de la pigmentación de la piel, es la capa externa de la piel y están en sistema inmune como linfocitos y células de Langerhans.
- ❖ La dermis: Encontramos bastantes fibras de colágeno en de la resistencia y elasticidad, encuentra abajo de la epidermis y es 20 a 30 más voluminoso que la epidermis, otras constituyentes glándulas sudoríparas y sebáceas, pelos
- ❖ Hipodermis: Capa más interna, presencia de adipocitos separados por tabiques fibrosos. (29)

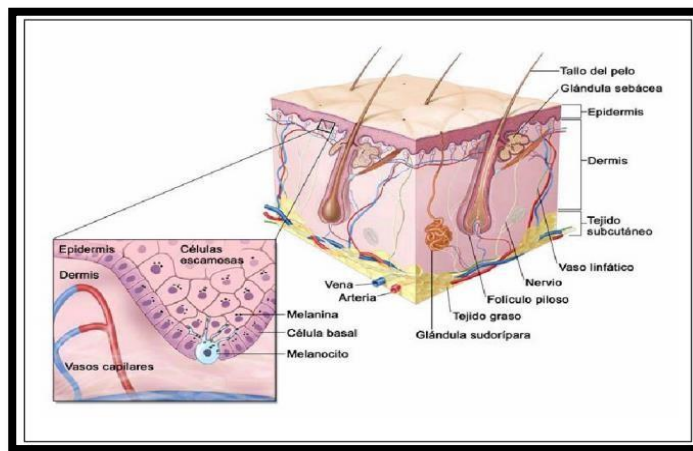


FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA PIEL Y SUS PARTES

Fuente: *Cordero A. (29)*

ACCIONES

Dentro de las acciones de la piel tenemos:

- ❖ Actúa como oposición contra agentes tóxicos, microorganismo e irradiación ultravioleta.
- ❖ Mantiene estabilización ácido-base.
- ❖ Organiza la temperatura corporal por aumento y disminución de vasos sanguíneos
- ❖ Actúa en la formación de la vitamina D para el cuidado de la piel.
- ❖ Es un órgano que detecta el dolor, temperatura y presión, presentadas en toda su superficie de la piel con terminaciones nerviosas.
- ❖ Actúa en el sistema inmunológico.

- ❖ Elaboración de melanina para la producción de la pigmentación a la piel.
- ❖ Restauración de heridas por el desarrollo de cicatrización. (29)

PIGMENTACIÓN DE LA PIEL

Se trata de la coloración, las alteraciones producidas por la coloración afectan dañan el color de la piel, el pigmento que se produce es la melanina es fabricado por las células de la piel cuando se lastiman la producción de la melanina. (30)

La pigmentación cutánea es un proceso que se da en las capas de dermis y epidermis:

- Pigmento ocurrido entre capilares y arterias oxigenada.
- Pigmento ocurrido en vénulas
- Almacén de bilis no metabolizada y carotenos
- Melanina epidérmica es el pigmento principal de individualización de la coloración humana. (31)

HIPERPIGMENTACIÓN

La hiperpigmentación es la opacidad de la piel causada por una abundancia anormalmente del pigmento cutáneo melanina, cuando hay exposición a la luz solar las células cutáneas especializadas melanocitos producen en gran cantidad del pigmento melanina, lo cual da el oscurecimiento de la piel. Las manchas de la hiperpigmentación dan mayormente a las personas piel oscura. (30)

La hiperpigmentación presenta manchas o áreas oscuras en la piel, se conoce como:

- Manchas de la edad: Llamada también como léntigos solares por son causadas por presentarse al sol se presentan en el cuerpo al ser expuestas, cara, cuello, escote, manos.
- Melasma: Conocida como cloasma es la alteración de la piel se desarrollan en grandes áreas de hiperpigmentación en la cara, es más frecuente en mujeres.

- Hiperpigmentaciones posts-inflamatorias: Produce cuando existe una lesión o traumatismo cutánea cicatriza, aparece en personas han sufrido acné o intervención estéticas (30).

BIOQUIMICA DE LA HIPERPIGMENTACIÓN

En nuestro organismo existen los melanocitos quienes son encargados del extracto de la melanina luego pasa de manera de melanoblasto por la dermis y estar en la mucosa, capa pigmentada. (27)

El melanocito se distingue de otros organelos citoplasmáticos igual que la melanosoma en donde se forma la melanina por acción de la tirosina, encontramos en la parte cutánea, de forma no definida y su evolución de proceso de transferencia, la melanización de las melanosomas de ahí a los queratinocitos conocido como melanogénesis, el desarrollo es regulado principalmente por la luz ultravioleta, factores hereditarios, estímulos hormonales. (27)

La melanogénesis se da en el interior de los melanosomas, por la tirosina. El proceso de oxidación de la tirosina está regulado por la L-DOPA y se forme como un mediador que es la dopaquinona. La magnitud de la pigmentación existe varios factores: en la degeneración de distintas capas de queratinocitos y nivel de difusión o suma de melanosomas en los queratinocitos; suma de melanina integrada en los melamosomas. (31)

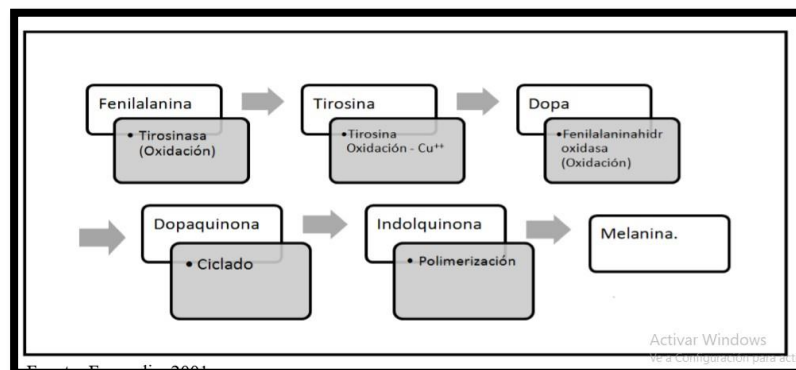


FIGURA 4. REACCIÓN QUÍMICA DEL PROCESO DE LA MELANINA EMPEZANDO DE LA FENILALANINA, PROCEDENTE POR LA TIROSINA

Fuente: Cabrera Silva S. (32)

El proceso de la hiperpigmentación es extraño. La falta de vitamina B12 provoca una reducción de glutatión intracelular y producir más la acción de la tirosinasa y acceder a un aumento en melanogénesis. (32)

SUSTANCIAS BLANQUEADORAS

Durante mucho tiempo y la experiencia, hay distintos compuestos aptos para despigmentar las regiones dañadas en la piel, se da un proceso en las vías metabólicas que se obtienen en los resultados, sin saber cuál es la indicada. (31)

Las dos formas para realizar los cambios son: decolar directamente la melanina ya realizada o evitar la nueva melanina que conduce por el proceso metabólico se da por la inhibición de la tirosinasa o de entrada de antagonistas de la tirosina; considerar ambas posibilidades en la cosmética. (29,30)

Sustancias que impiden la formación de la enzima tirosinasa

Comunes:

- ✓ Los polifenoles: están en distintas sustancias que impiden formación de la enzima tirosinasa y otras propiedades como: antioxidantes, antiinflamatorias como mediadores preventivos. Son considerados como sustratos de tirosinasa o inhibidores de ella. (19)
- ✓ Flavonoides: son encargados de captadores de radicales libres así evitando la peroxidación lipídica dado por la radiación ultravioleta, involucrado también en la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa. (19)

Sintéticos:

TABLA 2.SUSTANCIAS DESPIGMENTANTES SINTÉTICOS ENCONTRADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERPIGMENTACIÓN CUTÁNEA

SUSTANCIAS	FUNCIÓN
Peróxido de hidrógeno	Se integra en la crema, pero es poco estable, oxida la molécula de la melanina a formas menos coloreada.
Hidroquinona	Se usa una porción de 2% en pomada y por su poca transigencia cutánea, actúa la inhibición de la dopa a la melanina por medio de la tirosina
Ácido Ascórbico	Actúa como un agente antioxidante que daña la melanogénesis, evita la elaboración de los radicales libres y la impregnación de la radiación ultravioleta, es inestable, se oxida, y descompone en solución acuosa
Glutación	Se emplea como despigmentantes inactivando a la tirosinasa en una concentración de 0.1% y trabaja junto con otros despigmentates
Panteteína y derivados	Tienen propiedades antitirosinasa, más empleado es monobutanol panteteína y panteteína-5-sulfonato cálcico
Ácido azelaico	Se utiliza a menudo en la pigmentación humana, lentigos y pecas, actúa en los melanocitos y es efectivo al 4%; utilizado para el melasma y acné
Ácido Kójico	Es utilizado como despigmentantes más recetados por los dermatólogos, en una concentración del 2%

Fuente: Costin G. (30)

EFFECTO INHIBITORIO SOBRE LA ENZIMA TIROSINASA

“Las enzimas son catalizadores enzimáticos en reacciones químicas de alto peso molecular, tienen especificidad con sus sustratos y van disminuyendo la energía cuando ocurre las reacciones químicas”. (33)

Las enzimas son proteínas catalizadoras que son necesarias para creación de detergentes, fármacos, ensayos clínicos en clínica, ambientales y forenses. (33)

FORMA Y CINÉTICA DE LAS ENZIMAS

Las enzimas son estructuras tridimensionales conformadas por polímeros de aminoácidos y la capacidad de los átomos para la actividad enzimática. (4)

La forma de la enzima presenta un centro activo en donde hay unión de la enzima con sustrato por una unión de enlace químico y que es responsabilidad de ser específico y con una actividad catalizadora. La cinética de la enzima es la actuación de la enzima para su unión con sus sustratos y como respuesta de sus productos se realizan por ensayos enzimáticos con una velocidad de catálisis. (4)



La velocidad de la conformación a la que se forma el producto o lo que no existe el sustrato se denomina velocidad de catálisis; la concentración del sustrato perdura, que al verificar un aumento de esta hay un crecimiento lineal de la enzima y se disminuir poco a poco hasta encontrar la meseta que sería la velocidad máxima esperada. (33)

FACTORES QUE AFECTAN ACCIÓN ENZIMÁTICA

La acción enzimática es una reacción catalítica que transforma el sustrato en producto, en donde la acción es distinta y cambia durante el tiempo, su acción enzimática presenta diferentes factores como:

- La temperatura: las enzimas cuando está a temperatura alta su acción aumenta, porque las moléculas interactúan entre ellas y si disminuye es más lenta por no tener suficiente energía
- El Ph: las enzimas actúan a un pH determinado al medio en donde realice la acción, conformación adecuada y máxima acción
- La concentración de la enzima: si se incrementa la concentración existe un aumento de la reacción es porque existe más moléculas de enzima para estar juntas al sustrato.
- La concentración del sustrato: si se incrementa la concentración del sustrato existe un aumento de la reacción hasta un determinado punto. (4)

PRODUCTOS NATURALES DE LOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA TIROSINASA

Estos inhibidores encontramos en los hongos, bacterias y plantas; las plantas son las que más presentan esta actividad inhibitoria, con bastante compuesto presentes y no tienen reacciones adversas. Tenemos los inhibidores a partir de los hongos que es ácido azelaico presentes en las levaduras, ácido kojico presente en las especies de *Aspergillus* y *Penicilium*, metalotioneina presente es *Aspergillus niger*, agaritina presente en *Agaricus Bisporus*; polifenoles que están presente como metabolitos secundarios de la mayoría de las plantas con diferente actividad; tenemos los triterpenos encontrados en *Rhododendron collettianum*. (4)

POLIFENOLES

Conocidos como bio-sintetizados por las plantas (frutos, hojas, etc). Presenta estructuralmente grupos hidroxilo uno o más junto a anillos bencénicos. Los polifenoles presentan actividades antioxidantes y otras que son benéficas en la salud.

Encontramos en mayor cantidad en verduras y frutas con propiedad antioxidante, se dividen en no flavonoides y flavonoides; se reparten en fenilpropanoides como la lignina, flavonoides, taninos condensados y taninos hidrolizables como ácido gálicos en otros azúcares. (34)

COMPUESTOS FENÓLICOS

Son partes principales de metabolitos secundarios de los vegetales, cumplen funciones fisiológicas, son encargadas del desarrollo y proliferación de las plantas, combaten obstáculo para agentes patógenos, daño por la propagación ultravioleta. Los compuestos fenólicos presentan actividad de antioxidante por la presencia de quelantes metálicos, inhibición de la enzima lipooxigenasa y captadores de radicales libre. (35)

Se encontraron estudios en donde hay relación de datos sobre la negativa entre la ingestión de compuestos fenólicos y con el riesgo de tener enfermedades así las cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, cáncer y relacionadas de la edad se aconseja un consumo diario de 5 raciones de verdura o fruta para una ingesta adecuada para prevenir las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, los encontramos en las diferentes especies vegetales, condición de cultivo, horas de exposición solar. (35)

CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Para la cuantificación de fenoles totales está relacionada con la medición de la actividad antioxidante, en estudios realizados en especies si se juntan para medir actividad antioxidante.

Para la cuantificación y/o identificación de compuestos fenólicos se da en técnicas cromatográficas: como la capa fina, cromatografía de gases, la alta resolución; también con técnicas espectrofométricas. (35)

FUNDAMENTO DEL ENSAYO FOLIN-CIOCALTEU

Con este estudio se ayuda a medir en trabajos en vegetales con capacidad de compuesto fenólicos totales en productos vegetales; el fundamento es del ensayo de Folin-Ciocalteu en un pH básico, presentando una tonalidad azul y establecido en la espectrofotometría a 765nm. Para que el fundamento se realiza se da con el reactivo de molibdato sódico y walframato sódico en el que existe una reacción en la muestra con presencia de unión compuestos fenólicos. (34)

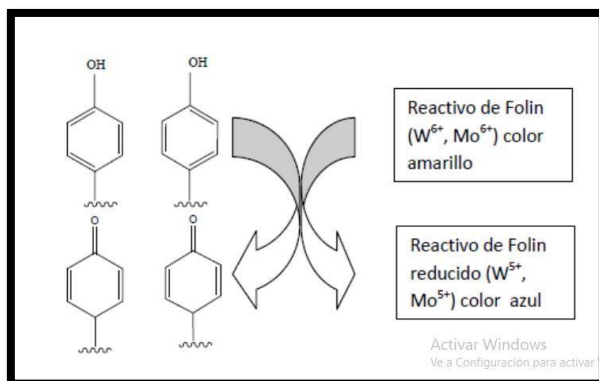


FIGURA 5.FUNDAMENTO DEL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

FUENTE: García Martínez Eva (35)

Se da por una reacción redox considerado que es un ensayo de medida de la actividad antioxidante total y la cuantificación es por espectrofotometría presentada en una recta utilizando como patrón al ácido gálico; sufre cambios debido a grandes magnitudes de muestra por determinar en un tiempo de reacción y concentración de los reactivos; es un ensayo muy útil y exacto. (35)

Para la determinación de polifenoles totales esta vinculados para propiedades antioxidantes de alimentos vegetales, como zumos de fruta, está relacionado con variedad de ensayos de evaluación de capacidad antioxidante. (35)

ANTIOXIDANTE

Son compuestos químicos que dificultan la oxidación de diversas sustancias como los ácidos, son encargados de las reacciones en los alimentos como en los seres vivos grasos. La oxidación es una reacción que son promovidas en cadenas por ser conocidas como radicales libres que son moléculas e iones que presentan electrón libre desapareado al final de la orbital de energía y continúan de forma libre para reaccionar con lípidos, ácidos nucleicos y proteínas conocidos como agentes reductores. (36)

Se dividen en sintéticos que son de estructura fenólicos con diferentes sustitución alquímica y naturales que son de estructura fenólicos, nitrogenadas, carotenoides. Podemos encontrar a todos en alimentos naturales como té, orégano, tomillo y alimentos procesados. En los organismos encontramos antioxidantes no enzimáticos presentan el glutatión, ácido urico, glutatión y antioxidantes enzimáticos como super oxidasa dismutasa, glutanina ejercen como aplazar las oxidaciones o restaurar las células afectadas. (36)

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La medición de la capacidad antioxidante se emplea como patrón la oxidación con consecuencia de un cambio, para determinar la actividad antioxidante se utilizará productos terminados y mediadores, por un medio cuantitativo y cualitativo a realizarse. (34)

ENSAYO DE 1,1 DIFENIL 2 PICRIL HIDRAZILA (DPPH)

Existen muchos procedimientos para determinar la actividad antioxidante en plantas medicinales y alimentos por ello se utilizó la técnica con la molécula 1,1 difenil 2 picril (DPPH) que consiste que este radical presenta un electron desapareado; por esta razón se incrementa la coloración violeta fuerte característico del radical. La reacción que se da es por donar un átomo de hidrogeno, se pierde la combinación originando una coloración violeta y desvanecer un color amarillo se da por una solución de DPPH reacción del sustrato antioxidante y medida espectrofotómetro a 517 nm. (34)

Existen números ensayos para ver la actividad antioxidante tenemos DPPH es un método que se mezcla con el medio orgánico y para la determinación se realiza por cromatografía en capa fina o por mediciones espectrofotométricas. (34)

2.4. MARCO CONCEPTUAL

Antioxidante: Compuesto endógeno y exógeno capaces de evitar oxidación molecular. con capacidad molecular o de inhibir y propagar la formación de reacciones en cadena de los radicales libres. (34)

Actividad Antioxidante: Capacidad biológica encargada impedir la oxidación de moléculas, efectos preventivos sobre determinadas enfermedades. (34)

Cromatografía: Es un proceso químico y físico donde los compuestos se mezclan o se separaran en fases como estacionaria y móvil. (23)

DPPH: Es un polvo cristalino de tono oscuro, es un compuesto de 2,2 difenil picril hidracilo, presenta radicales libres quien existe un descolorido así causando cambio de color para ser utilizado por procedimientos colorimétricos (34)

Extracto: Producto obtenido a partir de un organismo o parte de él, a través de la extracción con un solvente orgánico o agua. (34)

Fitoquímica: Estudia los componentes químicos de los vegetales, empezando de su organización molecular química y cualidad de los vegetales. (29)

In vitro: Es cultivo en recipientes de vidrio en condiciones aséptica a nivel laboratorio; es una técnica que permite la realización de un experimento que se realiza en tubo tiene que ser en ambiente adecuado o supervisado afuera del ser. (34)

Maceración: Se desarrolla una extracción de sólido a líquido ya que existe maceración de materia prima sólida durante un tiempo determinado, se realiza en: alimentos, hierbas, flores y otros. (29)

Principio activo: Componente que porta las cualidades farmacológicas presentes en la sustancia. (21)

Producto natural: Obtenido de origen animal y vegetal, las cuales no son expuestas a cambios sintéticos. Es una mezcla química o compuesto químico por un ser con actividad farmacológica. (21)

Tirosinasa: Enzima fundamental en la síntesis de la melanina, debido a que regula directamente la cantidad de melanina producida en la ruta bioquímica de la pigmentación. (21)

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.2.1. Material botánico

- Hojas y tallos de *Origanum vulgare* L. (Orégano)

3.2.2. Material de laboratorio

- Agua destilada
- Cronómetro
- Espátula
- Papel aluminio
- Pipeta automática de volumen variable
- Tubos de ensayo
- Vasos precipitados
- Frascos ámbar de vidrio
- Probetas graduadas
- Embudos
- Gradilla
- Cámara fotográfica
- Aspersor
- Cubetas para espectrofotometría
- 96 pocillos

3.2.3. Equipos

- Balanza analítica
- Estufa de secado
- Lector de microplacas Elisa
- Espectrofotómetro UV- Visible
- Estufa

3.2.4. Reactivos

- Reactivo Bornträger
- Metanol
- Reactivo Fehling A y B
- Ácido clorhídrico
- Reactivo Baljet
- Reactivo de Liebermann Burchard
- Ácido gálico
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Carbonato sódico al 7,5%.
- Trolox
- Reactivo DPPH
- Agua destilada
- Agua ultra pura
- Sustrato de Tirosinasa
- Tirosinasa
- Acido Gálico
- Potenciador de tirosinasa

3.2.5. Material de gabinete

- Computadoras
- Bibliografía especializada
- Fotocopias
- Papel bond A4

3.2.6. Otros

- Gorro
- Barbijo
- Guantes estériles
- Cinta másking

3.2. DISEÑO METOLOGICO

El trabajo de investigación tiene una investigación cuantitativa porque se obtienen datos numéricos.

3.2.1. TIPO DE DISEÑO INVESTIGACION

El trabajo de investigación debido al manejo de variables independiente y dependiente se tiene un diseño cuasiexperimental, transversal y prospectivo. Debido a que se usan grupos intactos y las mediciones se realizan en un solo tiempo y a futuro.

3.2.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación es exploratoria ya que se pretende investigar si el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. presenta actividad antitirosina y actividad antioxidante.

3.3. DETERMINACIÓN DE VARIABLES

3.3.1. VARIABLE IMPLICADAS

VARIABLE INDEPENDIENTE

Extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano)

Definición conceptual. - Se define como la cantidad de extracto obtenido por maceración en metanól de la planta seca (hojas y tallos), evaporado a sequedad obteniendo el principio activo para realizar estudios en diferentes concentraciones para determinar la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa y la actividad antioxidante. (18)

Definición operacional

Naturaleza	: Cuantitativa
Medición	: Directa
Escala de medición	: Razón

Procedimiento de medición: Pesar la cantidad obtenida de extracto metanólico seco de *Origanum vulgare* L. (Orégano) sobre la actividad de la enzima tirosinasa y actividad antioxidante. (18)

Instrumento de medición : Balanza analítica de precisión.

Expresión final de la variable: ug de extracto seco *Origanum vulgare* /mL.

VARIABLE DEPENDIENTES

Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare*

Definición conceptual. - Es la capacidad de inhibir los radicales libres, cuantificación de las moléculas antioxidantes presentes en este, por su capacidad de reaccionar con los radicales libres y presenta una tonalidad violeta. (21)

Definición operacional

Naturaleza : Cuantitativo

Medición : Directa

Escala de medición : Razón

Procedimiento de medición: Se evaluo los niveles de oxidación en el espectrofotometro, teniendo como resultado diferentes absorbancias tanto con el extracto como reactivo de DPPH y fenoles totales, obtener el porcentaje de captación de radicales libres. (21)

Instrumento de medición: Equipo de espectrofotometria para medir las absorbancias. (17)

Expresión final de la variable: Porcentaje de captación de radicales (%).

Actividad inhibitoria in vitro de la enzima tirosinasa

Definición conceptual. - Con esta prueba determinaremos la actividad de inhibición de la enzima tirosinasa mediante método espectrofotométrico con el lector de microplacas de Elisa, usando el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (1,37)

Definición operacional

Naturaleza : Cuantitativa

Medición : Directa

Escala de medición : Razón

Procedimiento de medición : Con una determinada concentración obtenida de extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano), un tamizaje por espectrofotometría y con diluciones que presentara actividad de la enzima tirosinasa. (1)

Instrumento de medición : Equipo de espectrofotometría con el lector de microplacas de Elisa para medir las absorbancia.(37)

Expresión final de la variable: Porcentaje de inhibición de tirosinasa (%).

3.3.2. VARIABLE NO IMPLICADAS

3.3.2.1. VARIABLE INTERVINIENTES

a) La muestra vegetal

- Tiempo de acopio: un mes
- Estado de crecimiento: floración
- Altitud de acopio: 3092 msnm
- Lugar de desecado: temperatura (12.99°C)

b) De la extracción

- Solvente y concentración del solvente: extracto metanólico
- Tipo de extracción: maceración
- Tiempo de maceración: 15 días

3.4. PRINCIPIO DE INCLUSION Y EXCLUSION

a) La muestra vegetal

- Criterios de inclusión
 - ✓ Plantas con hojas enteras y sanas.
 - ✓ Plantas en estadio maduro
 - ✓ Plantas secadas a temperatura ambiente
 - ✓ Plantas secadas en un ambiente oscuro y aireado

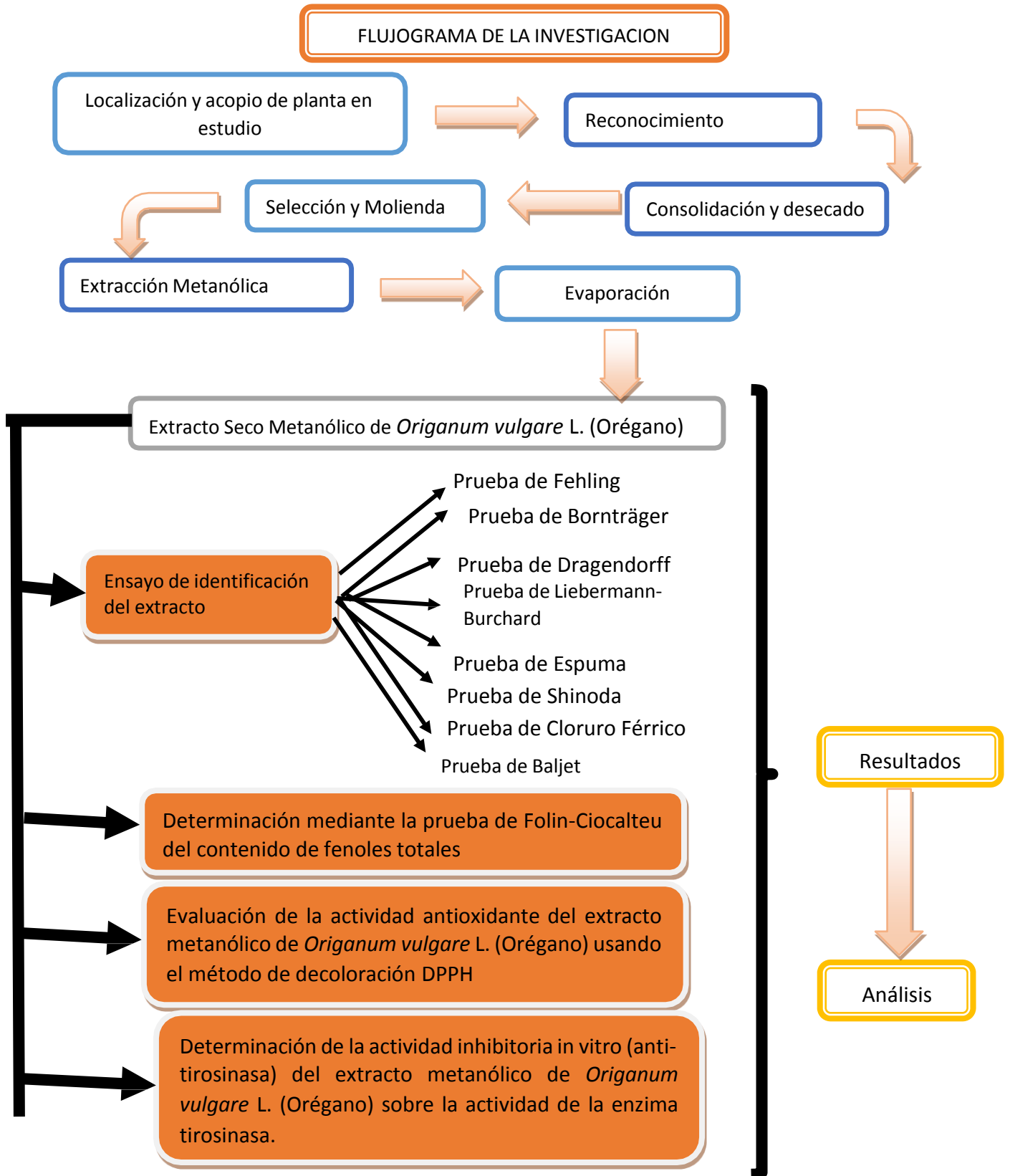
- Criterios de exclusión
 - ✓ Plantas que han sido atacadas por insectos o contengan plaguicidas
 - ✓ Plantas que presentaron hojas deterioradas

TABLA 3. RESUMEN DE VARIABLES IMPLICADAS

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES IMPLICADAS						
VARIABLES	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	Expresión final de la variable
Variable independiente Extracto metanólico de <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)	Cuantitativa	Directa	Razón	Pesar la cantidad obtenida de extracto metanólico seco de <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano) sobre la actividad de la enzima tirosinasa y actividad antioxidante.	Balanza analítica de precisión	ug de extracto seco <i>Origanum vulgare</i> /mL.
Variable dependiente Actividad antioxidante	Cuantitativo	Directa	Razón	La cantidad obtenida de extracto metanólico de <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano) sobre la actividad antioxidante con el reactivo de DPPH se medirá en un espectrofotómetro a longitud de onda 517 nm	Equipo de espectrofotometría para medir las absorbancias	IC 50 (ug/mL)
Variable dependiente Actividad Inhibitoria de la tirosinasa	Cuantitativo	Directa	Razón	Con determinada concentración obtenida de extracto metanólico de <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano), un tamizaje por espectrofotometría y con diluciones que presentara actividad de la enzima tirosinasa	Equipo de espectrofotometría con lector de microplacas de Elisa para medir las absorbancias	Porcentaje de inhibición de tirosinasa

Fuente: elaboración propia

3.5. PROCEDIMIENTO



Fuente: elaboración propia

3.6. Metodología

Recolección de la muestra

- a) Materia prima: Se trabajó con las hojas y tallos de orégano, cosechadas en la comunidad de Hancohocca, distrito de Marangani, provincia de Canchis del departamento de Cusco, se recolectó en la fecha de agosto del 2022, a continuación, detallaremos las coordenadas geográficas encontradas en mapa google.

Las coordenadas geográficas: la longitud: $71^{\circ}10'09''\text{w}$ y la latitud: $14^{\circ}21'24''\text{s}$ a una altitud de 3698 m.s.n.m. (38)



FIGURA 6. UBICACION GEOGRAFICA DE LA COMUNIDAD DE HANCCOHOCCA- CUSCO

Fuente: mapa satelite, vía internet (38)

- b) Recolección: Se recolectó las hojas en fase de floración, en horas de la mañana para evitar la transpiración y en forma manual.
- c) Transporte: Se empaquetaron en bolsas de papel craft, para evitar el oscurecimiento.
- d) Selección: Se eliminaron las hojas y tallos que presentaron deterioro, clasificando las hojas para la realización de la extracción del principio activo.
- e) Secado: Se realizó el secado en un ambiente fresco y donde no llegaba la luz solar. (39)

Reconocimiento y clasificación taxonómica del ejemplar en estudio

Se seleccionó una muestra de la planta entera *Origanum vulgare* L. (Orégano); luego se llevó al Herbario Vargas de la Universidad San Antonio Abad de Cusco para su reconocimiento y clasificación taxonómica. Anexo N°1

Obtención del extracto de *Origanum vulgare* L. (Orégano)

- Se pesó 500 g del material vegetal entre hojas y tallos (muestra seca)
- Se procedió a la molienda y tamizado del material vegetal
- Se colocó la especie en estudio en contacto con el metanol en un litro del solvente para la extracción del principio activo en un frasco ambar y se agitó diariamente por 15 días.
- La solución fue filtrada, después evaporada a sequedad en el equipo de baño maria a una temperatura 40 °C -45°C.
- Logrando obtener el extracto de oregano seco.

Método descrito por Sharapin. (39)

Determinación del porcentaje de rendimiento del extracto seco metanolico del *Origanum vulgare* L. (Orégano)

Para la determinación se realizo con el peso inicial de la muestra y el peso final del extracto seco: (40)

Donde:
$$\%EES = \frac{P.F}{P.I} \times 100$$

- %EES= Porcentaje de extracción del extracto seco
- P.F= Peso final del extracto seco.
- P.I= Peso inicial de la muestra seca molida.

Prueba de solubilidad

Se realizo pensando 5 mg del extracto en diferentes tubos para adicionar lo suficiente de solventes de distintas polaridades como: agua, metanol, etanol 40%,

etanol 70%, etanol 96%, acetona, acetato de etilo, cloroformo, benceno y hexano.
(40)

Identificación de componentes fitoquímicos del *Origanum vulgare* L. (Orégano)

Se realizaron las pruebas fitoquímicas para identificar los principales grupos de metabolitos presentes en el extracto metanólico; donde se trabajó con diferentes químicos en donde se observo precipitados y cambios de coloración según la Tabla 4. Utilizando la referencia de Mera Santa. (20)

TABLA 4. ESTUDIOS DE IDENTIFICACIÓN FITOQUIMICA

EVALUACIÓN		TECNICA	RESULTADO POSITIVO
Evaluación de Alkaloides:	de	1 mL de extracto + 3 gotas de reactivo Dragendorff	<i>Dragendorff:</i> <i>sedimento rojizo</i>
Prueba de Dragendorff			
Evaluación de Quinonas:	de	1 mL de extracto +1 mL de reactivo, Bornträger + agitación	Tono anaranjado-rojiza
Prueba de Bornträger			
Evaluación de Compuestos reductores:	de	2mL de reactivo Fehling A + 2mL de Fehling B + acaloramiento/ hervir por 1 minuto + 1mL de extracto/hervir por 1 minuto	Sedimento color ladrillo
Prueba de Fehling			
Evaluación de Saponinas:	de	1mL de extracto + 2mL de agua + agitación por 30 segundos	Presenta burbujeo durante 20 minutos aproximadamente
Prueba de Espuma			
Evaluación de Flavonoides:	de	2mL de extracto + Mg metálico + HCl concentrado	Tono amarillo a rojizo
Prueba de Shinoda			

Evaluación de Polifenoles: Prueba de Cloruro Férrico	de	2mL de extracto + 1mL de H ₂ O 3 gotas de FeCl ₃ al 1%	Tono azul (P- gálicos) Tono verde (P. catéquicos)
Evaluación de lactonas serquiterpénicas. Prueba de Baljet	de	2 mL de extracto + 1 a 2 gotas de reactivo Baljet	Tono de naranja a rojo
Evaluación de esteroides Prueba de Liebermann-Burchard	de	1ml de extracto + 3 a 4 del reactivo de Liebermann Burchard (10 gotas se anhídrido acético +2 gotas H ₂ SO ₄)	Tono azul, verde, rojo, anaranjado

Fuente: Mera Santa (20)

Determinación del contenido de fenoles totales por el procedimiento de Folin-Ciocalteu

El procedimiento Folin- Ciocalteu nos ayuda en la cuantificación de compuestos fenólicos en productos vegetales, se realiza en un pH básico y presenta un tono azul que es medido por espectrofotometría a 765 nm. (21)

Para la determinación del contenido de fenoles totales por el procedimiento de Folin-Ciocalteu descrito por Contreras Orellana Deisy (21) y se realizó con ligeras modificaciones a continuación:

a) Procedimiento

1) Preparación del patrón

- Se trabajó con ácido gálico como patrón a una concentración de 1 mg/mL disuelto en agua.
- Se prepararon diluciones de 50-100-150 ug/mL.
- Se trabajó con 100 µL de las diluciones anteriores, luego se agregó 200 µL del reactivo Folin Ciocalteu (1/10) se agitó constantemente.

- Transcurrido el tiempo, a cada dilución se agregó 3,9 mL de agua destilada y 800 uL de carbonato sódico al 7,5%.
- Se agitó las diluciones y se conservó en oscuridad por dos horas.
- Se midió la absorbancia a 765nm.
- Se realizó el ensayo por duplicado. (21)

2) Preparación de la muestra

- Se trabajó con el extracto metanólico *Origanum vulgare* L. en una concentración de 1 mg/ml disuelto en metanol.
- Se trabajó con 100 µL de la solución anterior, luego se agregó 200 µL del reactivo Folin-Ciocalteau (1/10) se agitó constantemente.
- Transcurrido el tiempo, a cada dilución se agregó 3,9 mL de agua destilada y 800 µL de carbonato sódico al 7,5%.
- Se agitó la dilución y se conservó en oscuridad por dos horas.
- Se midió la absorbancia a 765nm.
- Se realizó el ensayo por duplicado. (21)

Determinación de la capacidad antioxidante usando el procedimiento de decoloración DPPH

El procedimiento de decoloración DPPH es un método colorimétrico que está relacionado con la configuración estructural del compuesto, el fundamento se basa que el radical libre presenta un electrón de nitrógeno desapareado y da un color azul violeta; el radical libre se reduce por acción del antioxidante y estabiliza su acción oxidativa mientras que el color se va decolorando a un color amarillo, DPPH trabaja a temperatura ambiente aceptado los electrones para estar estable. Los resultados se miden en espectrofotometría entre 515 y 517 nm después de 30 minutos y la coloración. (21)

Para la determinación de la capacidad antioxidante usando el procedimiento DPPH descrito por Gutiérrez D - Brand Williams. (41,42) y con ligeras modificaciones a continuación:

a) Procedimiento

1) Preparación de la curva patrón

- Disolver 2 mg de Trolox en 10 mL de metanol y realizar las diluciones en base a la Tabla 5: (33)

TABLA 5.DIFERENTES DILUCIONES DE TROLOX

TOTAL DE TROLOX 2mg/10mL	METANOL	CONCENTRACION FINAL TROLOX (ug/mL)
0.375 mL	2.625 mL	25
1.125 mL	1.875 mL	75
1.875 mL	1.125 mL	125

Fuente: Gutiérrez D - Brand Williams. . (41,42)

2) Preparación del radical DPPH

- Se pesó 3,9 mg del radical DPPH en un matraz aforado y disolverlos con 100 mL de metanol 80%. La solución se sónico durante 15-20 minutos, hasta lograr una solución completamente homogénea. Se realizó la lectura de la solución y se diluyó con metanol hasta lograr lecturas de absorbancia menores o iguales a 0.8 nm. (41)

3) Preparación de las soluciones de extracto

- Se pesó 5 mg de extracto y se disolvió con 5 mL de metanol.
- A partir de esta solución se realizaron las siguientes diluciones: 1000, 500, 250, 125 y 62,5 ug/mL. (41)

4) Medición de la actividad antioxidante

- A 0.1 mL de cada solución de extracto y de Trolox se le adicionó 2,9 mL de la solución de DPPH (0.8 nm), se agitó vigorosamente y se almacenó en la oscuridad por 1 hora. Posteriormente se leyeron las absorbancias a 517 nm. (42)

- Para el control se colocó 0.1 mL de metanol y se le añadió 2.9 mL de la solución de DPPH (0.8 nm). El espectrofotómetro se calibró usando metanol 80%. (41)
- 5) Se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación: (42)

$$\% \text{ de inhibicion} = 100 * \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{ABS control}}$$

Determinación de la actividad inhibitoria in vitro de la enzima tirosinasa

Es una prueba colorimétrica, enzimática: el fundamento se da que la fenilalanina es hidroxilada por acción de la enzima tirosinasa para generar tirosina, la tirosina se oxida en Cu²⁺ por lo que existe producción de catecolaminas como la L-DOPA siendo la precursora de la melanina; estos cromóforos normalmente son medidas por una longitud de onda de 492 o 510nm, con una coloración amarilla. El ácido kojico, es un inhibidor irreversible de la tirosinasa genera una disminución de la velocidad de oxidación del sustrato. (1) (43)

Para la determinación de la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa descrito por Momtaz S. y Agustin A. (43,1) el procedimiento se realizó con ligeras modificaciones, se detalla a continuación:

- a) Procedimiento: para el ensayo enzimático se trabajó con un kit de tirosinasa: MAK257 conservado a una temperatura -20°C. (37)

1) Preparación de los reactivos:

- El agente de tirosinasa se usó a una concentración 0.5 ml
- El Sustrato de tirosinasa se disolvió con 220 µL de agua ultrapura
- La tirosinasa se disolvió con 220 µL de tampón de ensayo de tirosinasa . (37)

2) Preparación de Ácido Kójico 10 mM

- La solución de Ácido Kójico 10 mM se preparó a las concentraciones: 0.14, 0.71, 0.99 ug/mL. (37,43)

TABLA 6: PREPARACIÓN DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO KÓJICO 10mM

CONCENTRACIONES	Ácido Kójico 10 mM	BUFFER
0.14 ug/mL	5 µL	45 µL
0.71 ug/mL	25 µL	25 µL
0.99 ug/mL	35 µL	15 µL

FUENTE: Momtaz S. (43)

3) Preparación del extracto de *Origanum vulgare* L. (Orégano)

- Se pesó el extracto metanólico seco 3 mg y se disolvió con 3 mL de metanol.
- Se mezcló y disolvió.
- A partir de la solución anterior se preparó las diferentes concentraciones: 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL de soluciones usando el buffer tampón. (43)

TABLA 7: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL EXTRACTO DE *Origanum vulgare* L. (Orégano)

CONCENTRACIONES	SOLUCION DE EXTRACTO DE <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)	BUFFER
25 µg/mL	0,5 µL	19,5 µL
50 µg/mL	1 µL	19 µL
100 µg/mL	2 µL	18 µL
250 µg/mL	5 µL	15 µL
500 µg/mL	10 µL	10 µL

FUENTE: Momtaz S. (43)

4) Preparación de la solución de enzima tirosinasa

- Se midió el reactivo de tampón de ensayo de tirosina a un volumen de 48 μ L más tirosinasa a un volumen 2 μ L mezclar bien la solución.
 - Se incubó por 10 minutos a 25°C. (37)
- 5) Preparación de la solución de sustrato de tirosinasa
- Se midió el reactivo de tampón de ensayo de tirosina a un volumen de 23 μ L más sustrato de tirosinasa a 2 μ L más el agente de tirosinasa a 5 μ L.
 - Mezclar bien para el ensayo. (37)
- 6) Procedimiento para la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa.

TABLA 8: PREPARACIÓN EN LOS POCILLOS PARA EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO

	Blanco	Extracto a Conc. de 25 ug/mL	Extracto a Conc. de 50 ug/mL	Extracto a Conc. de 100 ug/mL	Extracto a Conc. de 250 ug/mL	Extracto a Conc. de 500 ug/MI	Patrón a Conc. de 0.14 ug/mL	Patrón a Conc. de 0.71 ug/mL	Patrón a Conc. 0.99 ug/mL
Extracto de <i>Origanum vulgare</i> L.		20 uL	20 ul	20 uL	20 uL	20 uL			
Patrón de Ácido Kójico							20 uL	20 uL	20 uL
Buffer	20 uL								
Enzima (Tirosinasa)	50 uL	50 uL	50 uL	50 uL	50 uL	50 uL	50 uL	50 uL	50 uL
Incubación	Mezclar bien e incubar a 25 ° C a 10 minutos								
Sustrato (L-Tirosina)	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL	30 uL
Espectofo Tometria	Realizar a lectura a 510 nm cada 10 minutos por una hora.								

FUENTE: Momtaz S. (43, 19)

- 7) La medición de la absorbancia se realizó en modo cinético, en donde se eligió dos puntos de tiempo 1 y tiempo 2 en rango lineal de la gráfica para obtener valores correspondientes a una absorbancia 1 y absorbancia 2. (37)

$$Pendiente = \frac{Absorbancia\ 2 - Absorbancia\ 1}{Tiempo\ 2 - Tiempo\ 1}$$

- 8) El cálculo se realizó usando la pendiente para todas las muestras, incluida la enzima, el % de inhibición relativa esta expresada por: (37)

$$\% \text{ de inhibición muestra} = \frac{Pendiente\ Blanco - Pendiente\ de\ muestra}{Pendiente\ Blanco} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición control} = \frac{Pendiente\ Blanco - Pendiente\ control}{Pendiente\ Blanco} \times 100$$

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica utilizada fue la observación experimental en laboratorio en donde se visualizaron reacciones en la parte experimental en tiempo real. Las fichas de recolección de la especie en estudio y recolección de datos de la actividad antioxidante e inhibitoria de la tirosinasa. (Anexo N° 2-6)

3.8. Técnicas de análisis de datos estadísticos

- Los análisis fueron realizados por duplicado en la determinación de la cantidad de fenoles totales por el procedimiento de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método de DPPH en el equipo espectrofotometría y por triplicado para la actividad inhibitoria de la tirosinasa.
- Para el análisis de los resultados se utilizó formato estadístico Microsoft Excel, en el cual se crearon y diseñaron en una hoja de cálculo para determinar la cantidad de fenoles totales, la actividad antioxidante y actividad inhibitoria de la tirosinasa, para el extracto con su respectiva desviación estándar
- Para la expresión de los resultados se utilizó gráficos lineales.

CAPITULO IV
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. Identificación de componentes fitoquímicos del *Origanum vulgare* L. (Orégano)

4.1.1. Determinación del porcentaje de rendimiento del extracto seco metanolico del *Origanum vulgare* L. (Orégano)

**TABLA 9.RESULTADO DEL PORCENTAJE DE RENDIMEINTO DEK
EXTRACTO DE OREGANUM VULGARE L (OREGANO)**

MUESTRA	DATOS
Peso final del extracto seco.	43,236 g
Peso inicial de la muestra seca molida	500 g
Porcentaje de extracción del extracto	8.6472 %

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN, ANALISIS Y DISCUSIÓN

En la tabla N°9 se muestra el resultado del porcentaje de rendimiento de la extracción por maceración de la planta *Origanum vulgare* L. (Orégano) en metanol es de 8.6472%, este resultado es necesario para la realización del trabajo de investigación. El % de rendimiento ayuda a saber qué cantidad de muestra se requiere para tener cierta cantidad de extracto y también que cantidad necesaria para realizar ensayos durante la investigación. (40)

Presenta una cierta similitud con la investigación **Agustin, Calderón y Martinez, 2015** (1), donde él % de rendimiento de *Lippia graveolens* (oregano) en el extracto metanol es 9.70%, existe una diferencia minima entre la investigación, el % rendimiento se da por factores como que parte de la planta se utiliza, el método de extracción, temperatura y la afinidad a los solventes. Las moléculas presentes en la planta de estudio son de naturaleza polar por ende fueron disueltas en metanol por ser una sustancia polar. (1)

4.1.2. Marcha fitoquímica

**TABLA 10.MARCHA FITOQUIMICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
ORIGANUM VULGARE L. (ORÉGANO)**

EVALUACIÓN	DETERMINACIÓN	RESULTADO
Prueba de Dragendorff	Alcaloides	-
Prueba de Bornträger (KOH10%)	Quinonas	+
Prueba de Fehling	Azúcares reductores	++
Prueba de Espuma	Saponinas	-
Prueba de Shinoda	Flavonoides	++
Prueba de Cloruro Férrico	Polifenoles	+++
Prueba de Baljet	Lactonas serquiterpénicas	+
Prueba de Liebermann Burchard	Esteroides	-

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

Leyenda:

- Abundante: +++
- Poco: ++
- Escaso: +
- Ausente: -

INTERPRETACIÓN

En la Tabla N° 10 se observa el resultado de la marcha fitoquímica realizada al extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. identificándose abundante cantidad de polifenoles, poca cantidad de azúcares reductores y flavonoides; escasa cantidad de lactonas serquiterpénicas y quinonas; y ausencia de alcaloides y esteroides.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La marcha fitoquímica nos permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en las plantas; para así trabajar con fines medicinales, económicos y científica (36). La existencia de coloración y formación de precipitados se considera como resultado positivo. (45)

Comparando nuestros resultados con otra investigación, como la desarrollada por Lauriano Acosta (46) en la que usaron solventes como agua para realizar extractos de los tallos y hojas de orégano, se evidenciaron la presencia de terpenos, fenoles, azúcares reductores y carbohidratos. Es importante esta para la determinación de la actividad antioxidante y antitirosinasa porque deben estar presentes fenoles y flavonoides.

4.1.2. Determinación de la solubilidad del extracto

TABLA 11. RESULTADOS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD
H ₂ O	++
Metanol	+++
Etanol 40%	+++
Etanol 70%	+++
Etanol 96%	++
Acetona	++
Acetato de Etilo	++
Cloroformo	+
Benceno	-
Hexano	-

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

Leyenda:

- Muy Soluble: +++
- Soluble: ++
- Poco Soluble: +
- Insoluble: -

INTERPRETACIÓN

De la Tabla N°11 se observa los resultados de la determinación de la solubilidad del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) expuestos a diferentes solventes con diferente polaridad. El extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) presenta mayor solubilidad en solventes polares como el agua, metanol y etanol; debido a que el extracto es de naturaleza polar.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La solubilidad se basa en la relación que existe entre distintas fuerzas intermoleculares de compuestos entre sí, con una sustancia para disolverse en otra para formar un sistema homogéneo según su naturaleza; por ello es importante conocer el carácter polar o apolar de la sustancia por ejemplo los compuestos que presentan más grupos funcionales hidroxilos (OH) tienen mayor polaridad por ello no son solubles en éter etílico. (47) No se evidencio información bibliográfica de la determinación de la solubilidad del *Origanum vulgare* L. (Orégano) con otras investigaciones.

4.2. Determinación de la cantidad de fenoles totales por el procedimiento de Folin-Ciocalteu

4.2.1. De la curva de calibración

TABLA 12. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO DE CONCENTRACIÓN CON ABSORBANCIA

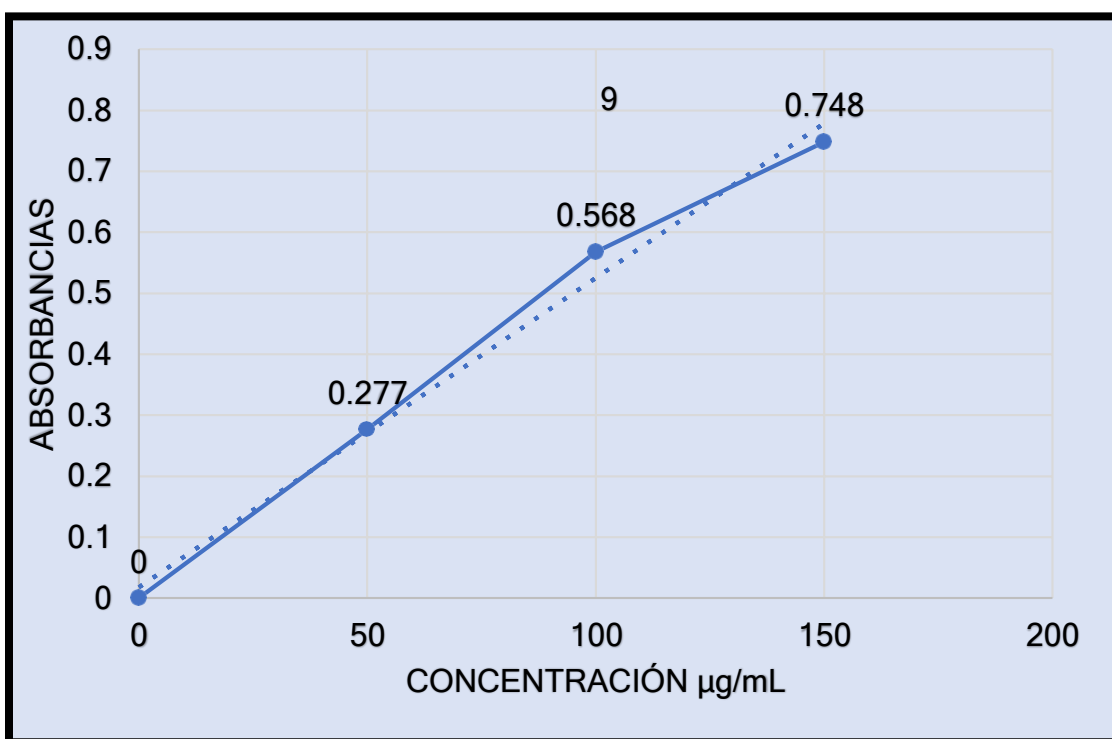
CONCENTRACION µg/mL	ABSORBANCIA 765 nm	PROMEDIO DE LAS LECTURAS	DESVIACIÓN ESTANDAR
50	0.241	0.277	0.05
	0.312		
100	0.602	0.568	0.05
	0.534		
150	0.752	0.748	0.01
	0.744		

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°12 se observa los datos de la concentración y absorbancias del ácido gálico para la curva de calibración. Se preparó concentraciones de 50 ug/mL, 100 ug/mL y 150 ug/mL y las absorbancias promedio son 0.277, 0.568 y 0.748 existiendo una relación directamente proporcional ya que cuando hay aumento de la concentración va aumentando las absorbancias.

GRÁFICO 1. CURVA DE CALIBRACIÓN USANDO ÁCIDO GÁLICO PARA DETERMINAR POLIFENOLES TOTALES



Fuente datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la grafico N°1 que presenta la curva de calibración de ácido gálico (patrón) donde indica la relación entre la concentración del ácido gálico (patrón) y sus absorbancias, representado por la ecuación de la recta $Y=0.0051X+0.018$, con un $R^2=0.9903$, la cual nos permite determinar la cantidad de polifenoles totales en el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).

En la gráfica precedente se observa la dispersión de los datos, indicando el porcentaje del ajuste obteniendo un modelo lineal es decir el porcentaje de la variación de la absorbancia está indicada por el comportamiento de la concentración de ácido gálico siendo de un 99.03%, existiendo una relación directa entre la concentración y absorbancia del patrón de ácido gálico.

4.2.2. Resultado del contenido de polifenoles totales

TABLA 13. CONTENIDO DE POLIFENOLES EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE ORIGANUM VULGAE L.

MUESTRA	ABSORBANCIA 765 nm	PROMEDIO DE LAS LECTURAS	DESVIACIÓN ESTANDAR	CONTENIDO POLIFENOLES
Extracto metanólico <i>Origanum vulgare</i> L.	0.374	0.382	0.01	71.37 µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto
	0.389			

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°13 se observa el valor encontrado de contenido de polifenoles de la muestra del extracto metanólico *Origanum vulgare* L. (Orégano), presenta una absorbancia promedio de 0.382 y su contenido de polifenoles totales es 71,37 µg de equivalentes de ácido gálico/mg de extracto, se calculó usando la ecuación del gráfico N°1.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El extracto metanólico *Origanum vulgare* L. (Orégano), expresados en 71,37 µg de ácido gálico/mg de extracto seco. El dato encontrado para determinar la cantidad de fenoles totales nos permite corroborar la actividad antioxidante.

Cordova Lemus Dina, 2019 (48) en su estudio sobre la determinación de la concentración de polifenoles totales en el extracto metanólico al 75% de *L.*

graveolens (Orégano), se encontró el contenido de polifenoles totales a una concentración de 55,31 µg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco.

Zambrano Zamora Gilson, 2018 (49) en su estudio sobre la cuantificación de compuestos fenólicos demostró que el orégano extraído con etanol al 70% presenta 303,63 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto, y con menor concentración el orégano extraído con etanol al 60% siendo 107,59 mg equivalentes de ácido gálico /g de extracto.

4.3. Determinación de la capacidad antioxidante usando el procedimiento de decoloración DPPH

4.3.1. De la curva de calibración de Trolox

**TABLA 14. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL PATRÓN DE TROLOX
CONCENTRACIÓN CON ABSORBANCIA**

CONCENTRACION ug/mL	ABSORBANCIA 517 nm	PROMEDIO DE LAS LECTURAS	DESVIACIÓN ESTANDAR
25	0.604	0.6215	0.00
	0.639		
75	0.377	0.3495	0.04
	0.322		
125	0.119	0.1210	0.02
	0.123		

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPETACIÓN

En la tabla N°14 se observa las absorbancias de las pruebas realizadas por duplicado en relación con la concentración del patrón de trolox; se trabajó con tres concentraciones distintas que va desde 25 ug/mL, 75 ug/mL, 125 ug/mL que va de menor a mayor concentración, presentando una absorbancia promedio de 0.6215, 0.3495, 0.1210 que va disminuyendo; existiendo una relación que es inversamente proporcional.

TABLA 15. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL TROLOX

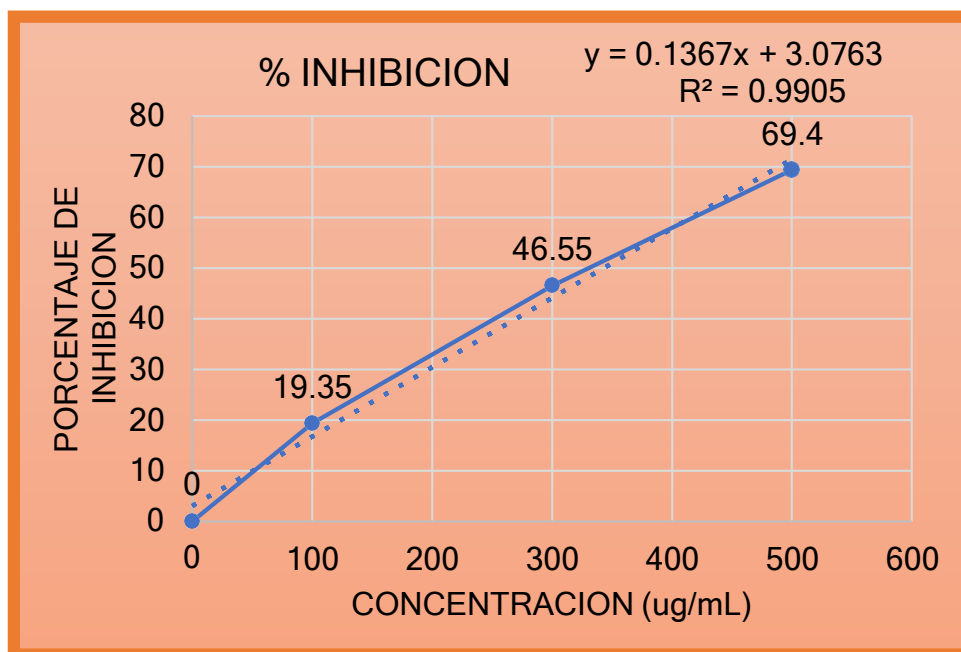
CONCENTRACIÓN ug/mL	% INHIBICION
25	19,35
75	46,55
125	69,40

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPETACIÓN

En la tabla N°15 se observa la relación de la concentración del patrón Trolox (μmol) con el porcentaje de inhibición, se calculó el porcentaje de captación de radical libre; teniendo como resultado un 69,40% a una concentración de 125 ug/mL , 46,55% a una concentración 75 ug/mL y 19.25% a una concentración de 75 ug/mL, en conclusión, se puede afirmar que a mayor concentración del patrón existe mayor actividad antioxidante, existiendo una relación directamente proporcional como se muestra en el gráfico N° 2.

GRÁFICO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN



FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la gráfico N°2 se presenta la curva de calibración de la concentración del patrón Trolox (ug/mL) con el porcentaje de inhibición, observando una línea recta ascendente que va desde 19,35% a 69,4%, con una ecuación $Y=0.1367X + 3.0763$, con un $R^2=0.9905$; nos indica el porcentaje del ajuste al modelo lineal es decir al porcentaje de la variación de la absorbancia, se da a través del comportamiento de la concentración del Trolox para luego expresar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L (Orégano).

En la gráfica procedente se observa la dispersión de los datos, según el análisis estadístico que existe una relación directa entre la concentración y el porcentaje de inhibición del Trolox siendo de un 99.05%.

4.3.2. De la actividad antioxidante del extracto del metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano)

Del extracto metanólico *Origanum vulgae* L

TABLA 16. ABSORBANCIAS DEL EXTRACTO METANÓLICO EN EL ENSAYO DPPH

CONCENTRACION ug/mL	ABSORBANCIA 517 nm	PROMEDIO DE LAS ABSORBANCIAS	DESVIACIÓN ESTANDAR
31.25	0,767	0,77	0,03
	0,782		
62.50	0,751	0,73	0,04
	0,715		
125	0,633	0,64	0,01
	0,647		
250	0,436	0,46	0,03
	0,494		
500	0,153	0,17	0,01
	0,193		

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPETACIÓN

En la tabla N°16 se observa la relación que hay entre la concentración del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) y las absorbancias obtenidas por duplicado, las absorbancias promedio nos ayudó a realizar los cálculos para determinar la actividad antioxidante, habiendo obtenido para la concentración de 31,5 ug/mL una absorbancia de 0,77, para 62,4 ug/mL una absorbancia de 0,73, para 125 ug/mL una absorbancia de 0,64, para 250 ug/mL una absorbancia de 0,46, para 500 ug/mL una absorbancia de 0,17, existiendo una relación inversamente proporcional.

TABLA 17.RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO

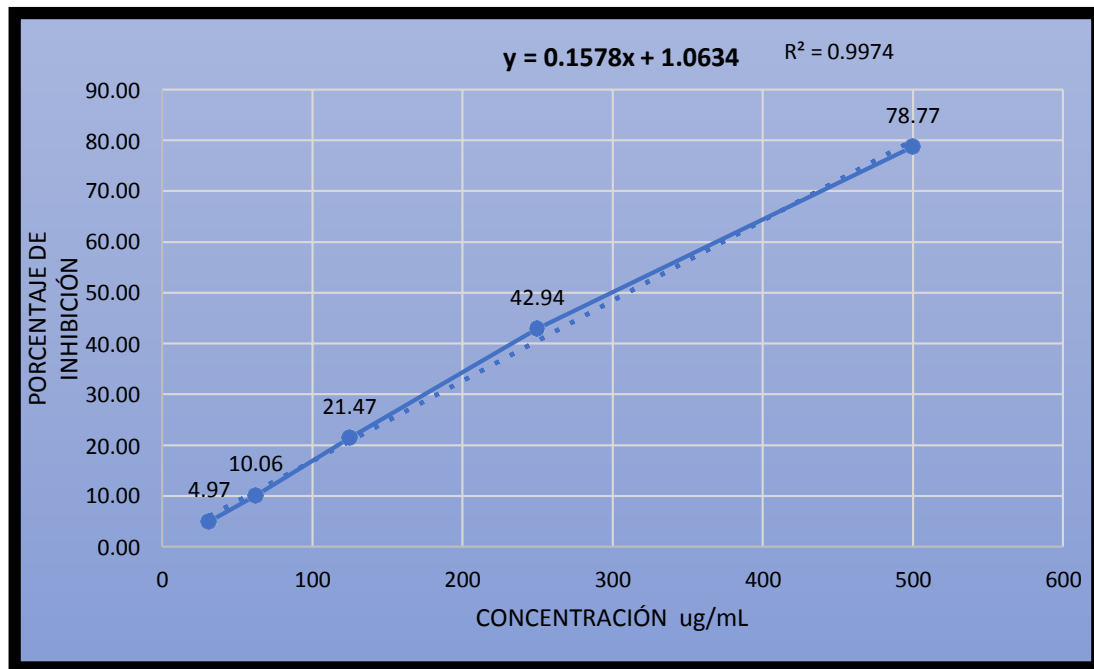
CONCENTRACION ug/mL	% INHIBICION
31,25	4,97
62,5	10,06
125	21,47
250	42,94
500	78,77

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPETACIÓN

En la tabla N°17 se observa la relación que hay entre la concentración del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) y el porcentaje de inhibición; donde se observa que la concentración y el porcentaje va de menor a mayor por ello hay una relación directamente proporcional como se muestra en el gráfico N° 3.

GRÁFICO 3. RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO



FUENTE: Datos experimentales obtenidos

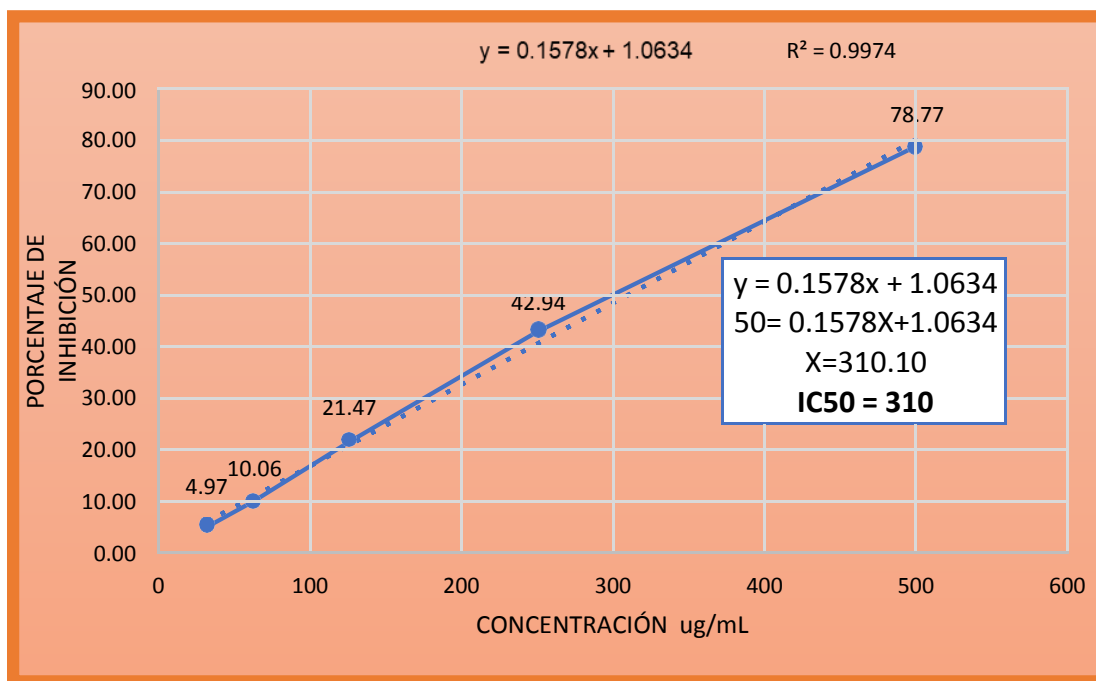
INTERPRETACIÓN

En la grafica N°3, se presenta la curva de calibración de la concentración del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) con el porcentaje de inhibición, observando una línea recta ascendente que va desde 4,97% a 10,06%,21,47%,42,94%, 78,77% con una ecuación $Y=0.1578X + 1.0634$, con un $R^2=0.9974$; nos indica el porcentaje del ajuste al modelo lineal es decir al porcentaje de la variación de la absorbancia se da a través del comportamiento de la concentración para expresar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgae* L.

En la gráfica anterior se observa la dispersión de los datos, según el análisis estadístico que existe una relación directa entre la absorbancia y concentración del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) es de un 99.74%.

4.3.3. Significancia de la concentración de inhibición 50 (IC50)

GRÁFICO 4. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO)



FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN, ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el gráfico N°4 se observa el valor de IC50 del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano); con el resultado de 310, expresada como la cantidad de antioxidante (extracto) necesaria para reducir la concentración de DPPH a la mitad, se debe tener en cuenta que los valores menores representan mayor actividad antioxidante (46).

Lauriano Acosta Arturo, 2017 (46) en su tesis sobre los extractos acuosos de Orégano (*Origanum vulgare*), Chincho (*Tagetes elliptica*) y Acedera (*Rumex crispus*) se comparó la capacidad antioxidante de los extractos; se concluyó que los extractos hidrofílicos como el metanol tienen menor actividad antioxidante, pues presentó un equivalente a 438,52 micromoles de Trolox, en tanto que los extractos lipofílicos (hexano/isopropanol) presentaron 82,72 micromoles de Trolox.

Galvez Calla Luis, 2021 (50) se concluyó que para la actividad antioxidante equivalente al trolox, el que tiene mejor poder de captación de radical libre es el extracto en comparación con el gel del extracto de *Origanum vulgare* al 25% que presentó un IC50 de 98,485mg/mL y para el estándar trolox tiene IC50 es 2,99 ug/mL.

4.4. Determinación de la actividad inhibitoria in vitro de la enzima tirosinasa

4.4.1. Del patrón de ácido kójico

TABLA 18.PREPARACION DEL ÁCIDO KÓJICO 10 mM A DIFERENTES CONCENTRACIÓN

MUESTRA ESTANDAR	CONCENTRACIONES	% DE INHIBICIÓN	IC 50
Ácido Kójico 10 mM	0,14 ug/mL	26,66%	0,35 ug/mL
	0,71 ug/mL	94,66%	
	0,99 ug/mL	96,66%	

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°18 se observa la relación entre la concentración del patrón de ácido kójico con el porcentaje de inhibición; tenemos las concentraciones es 0,14 ug/mL, 0,71 ug/mL y 0,99 ug/mL, mientras que el porcentaje de inhibición es 26,66%, 94,66% y 96,66% ambos resultados van de menor a mayor concentración, expresando una relación directamente proporcional; presentando una concentración inhibitoria de 0,35 ug/mL.

4.4.2. Extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. y su actividad inhibitoria in vitro de la enzima tirosinasa

TABLA 19. CORRELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON ABSORBANCIA DEL EXTRACTO METANÓLICO

CONCENTRACION <i>Origanum vulgare</i> L ug/mL	ABSORBANCIA 510 nm TIEMPO 30-10 MIN		PROMEDIO DE LAS ABSORBANCIAS TIEMPO 30-10 MIN	
	25	0,296	0,141	0,303
0,314		0,148		
0,299		0,134		
50	0,269	0,127	0,297	0,132
	0,302	0,139		
	0,295	0,13		
100	0,295	0,145	0,252	0,127
	0,178	0,094		
	0,283	0,144		
250	0,207	0,106	0,201	0,102
	0,175	0,089		
	0,223	0,112		
500	0,146	0,093	0,131	0,086
	0,113	0,08		
	0,134	0,085		

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°19 se observa la relación que hay entre la concentración del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) y las absorbancias de la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa que se realizó por triplicado. Cabe mencionar que se tomaron los tiempos 10 minutos y 30 minutos porque se observó una mayor inhibición en estos dos tiempos.

TABLA 20. RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO

MUESTRA	CONCENTRACIONES	% DE INHIBICIÓN	IC 50
Extracto metanolico de <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)	25 µg/mL	1,21%	351,43 µg/mL
	50 µg/mL	4,51%	
	100 µg/mL	24,14%	
	250 µg/mL	29,45%	
	500 µg/mL	72,56%	

FUENTE: Datos experimentales obtenidos

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°20 se observa la relación que hay entre la concentración del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) y el porcentaje de inhibición, donde se observa que la concentración va de menor a mayor y también el porcentaje de inhibición existiendo una relación directamente proporcional, presentando una concentración inhibitoria de 351,43 µg/mL.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el ensayo de la actividad in vitro del extracto sobre la enzima tirosinasa, donde el patrón ácido kójico presentó un $R^2=0,9104$ lo que evidencia un porcentaje de 91,04% de correlación, se obtuvo una concentración inhibitoria de 0,35 µg/mL para el extracto de *Origanun vulgare*.

En el ensayo del extracto metanolico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) se obtuvo un gráfico de la concentración y el porcentaje de inhibición presentando un $R^2=0,954$ lo que invidencia un porcentaje de 94.4% de correlación y la ecuación de la recta $Y=0.1419X+0.131$.

Agustin, Calderón y Martinez, 2015 (1), en su tesis sobre la actividad de ocho especies de plantas nativas usadas tópicamente, la especie *Lippia graveolens* (Orégano de monte o mexicano) presentó un porcentaje de inhibición a una concentración de 2mg/mL de sus extractos diclorometánicos del 22,2% y de 4,2% para el extracto metanólico.

Comparado con nuestros resultados, podemos afirmar que nuestro extracto presentó un mayor porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa, lo que sustentaría su potencial uso despigmentante.

CONCLUSIONES

1. Se determinó la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa y la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).
2. Se realizaron estudios preliminares del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano): el porcentaje de rendimiento es 8.6472 % y se identificó a través de la marcha fitoquímica la presencia de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano), destacando la presencia abundante de compuestos polifenoles, escasa cantidad de azúcares reductores y flavonoides, ausencia de compuestos alcaloides y esteroides. En las pruebas de solubilidad el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) presenta mayor solubilidad en solventes polares como agua, metanol, etanol 40%, etanol 70 % y etanol 96%; y es insoluble en benceno, hexano.
3. Se determinó la cantidad de polifenoles totales en el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L (Orégano) usando el ensayo de Folin-Ciocalteu usando como patrón el ácido gálico. El contenido de polifenoles totales es de 71,37 μg de equivalentes de ácido gálico/mg de extracto seco.
4. Se demostró la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) usando el método de decoloración DPPH alcanzando un porcentaje de captación de radicales libres de 78,77%, presentando un IC50 de 310 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto.
5. Se determinó la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) teniendo como patrón el ácido kójico que alcanzó un IC50 de 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) alcanzó un IC50 de 351,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

“A LAS AUTORIDADES Y DOCENTES DE LA UNIVERSIDAD SAN ANTONIO ABAD DE CUSCO”

- Incentivar al estudio en plantas medicinales, por ello se debe ejecutar nuevos laboratorios, equipos y la compra de reactivos que ayuden a mejorar los trabajos de investigación a presentar.
- Fomentar la publicación en revistas científicas para profundizar con el tema de la actividad tirosinasa y antioxidante en plantas de la región.
- Capacitar a los estudiantes en el manejo de los equipos de laboratorio desde que son estudiantes.

“A LOS ESTUDIANTES DE LA ESCUELA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA”

- Realizar estudios sobre la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa y actividad antioxidante del aceite esencial del *Origanum vulgare* L. (Orégano).
- Investigar el potencial uso de los extractos metanolico del *Origanum vulgare* L. (Orégano) como conservante y antioxidante.
- Establecer una forma farmacéutica o cosmética para los extractos de *Origanum vulgare* L. (Orégano).
- Evaluar la actividad antioxidante, actividad in vitro sobre la enzima tirosinasa en diferentes plantas que presenta bastante polifenoles.

Referencias Bibliográficas:

1. Agustin A, Calderón M, Martínez A. Actividades antitirosinasa de ocho especies de plantas nativas de Mesoamérica usadas en aplicaciones dérmica. [Tesis]. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2015
2. Muñoz Julián, Katalina; Londoño L. Gabriel. Efecto de técnica de extracción de ruta graveolens sobre la actividad antitirosinasa y correlación entre la inhibición enzimática, el contenido de compuestos fenólicos y la citotoxicidad. (RFQF) 2007; 14(2): 78-83
3. Cáceres Estrada Armando. Caracterización de la actividad antioxidante de extractos de especies nativas en género Piper y cuantificación de metabolitos secundarios con potencial de desarrollo. [Tesis]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2011
4. Gerardo M. Casañola Martin. La enzima tirosinasa: 2 inhibidores de origen natural y sintético. Raco cat. 2013. 270 a 276
5. Laurente Pachamango. Katherine, Lachos Miguel Vanessa. Efecto antimicótico in vitro de aceite esencial Origanum vulgare frente a cepas de Trichophyton rubrum". [Tesis]. Perú-Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo- Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2018.
6. Guevara G. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto de Hidroetanólico de las hojas de Origanum majorana en cepas de Proteus spp. [Tesis]. Colombia: Universidad Regional Autónoma de los Andes -Facultad de Ciencias Médicas; 2018
7. Morales Prado Luis Emitterio. Fisiología y morfometría de Origanum vulgare L. en diferentes sistemas de producción y dosis de abono orgánico. [Tesis]. La Paz, Baja California Sur. Centro de investigación biológicas del Noroeste S.C. Programa de Estudios de Posgrado, 2015
8. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science 2, 152-159.

9. Falleh, H., Ksouri, R., Boulaaba, M., Guyot, S., Abdelly, C., Magné, C., 2012. Phenolic nature, occurrence and polymerization degree as marker of environmental adaptation in the edible halophyte *Mesembryanthemum edule*. *South African Journal of Botany* 79, 117-124
10. Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J., 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food Chemistry and Toxicology* 45, 328-336
11. Jdey, A., Falleh, H., Jannet, S. B., Hammi, K. M., Dauvergne, X., Ksouri, R., & Magné, C. (2017). Phytochemical investigation and antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase performances of six medicinal halophytes. *South African Journal of Botany*, 112, 508-514.
12. Chamorro Monago Jimena M., Pampa Mamani Diana Carolina D. Efectividad del orégano (*origanum vulgare*) en el tratamiento de los espasmos abdominales em personas de 15-30 años que viven en el pueblo Joven Columna Pasco Enero – Abril del 2018. [Tesis]. Perú-Cerro de Pasco. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Facultad de Ciencias de la Salud. 2019
13. Yan A. Azizi, S. Janke. Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) [Internet] Murgia 2016 [consultado 30 de octubre 2021]. Disponible en: <https://www.evok.com.co/ingredientes-evok/oregano/>
14. Licina, B. Z., Stefanovic, O. D., Vasic, S. M., Radojevic, I. D., Dekic, M. S., & Comic, L. R. (2013). *Biological activities of the extracts from wild growing Origanum vulgare L. Food Control*, 33(2), 498–504. doi:10.1016/j.foodcont.2013.03.020
15. Patil, S., Srinivas, S., Jadhav, J., 2014. Evaluation of crocin and curcumin affinity on mushroom tyrosinase using surface plasmon resonance. *International Journal of Biological Macromolecules* 65, 163-166.
16. Ismail, T., Shafi, S., Srinivas, J., Sarkar, D., Qurishi, Y., Khazir, J., Alam, M.S., Kumar, H.M.S., 2016. Synthesis and tyrosinase inhibition activity of trans-stilbene derivatives. *Bioorganic Chemistry* 64, 97-102

17. Mantilla A. Evaluación de la producción flavonoides a partir de orégano (*Origanum vulgare*) mediante la técnica de suspensión celular. [Tesis]. Colombia. Universidad de Santander Facultad de Ciencias Exactas, Físicas Naturales. Bucaramanga, Colombia. 2018
18. Torrenegra A., Miladys E. Evaluación de la Actividad Antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de orégano (*Oreganum vulgare*), orégano “borde blanco” (*Origanum vulgare* ssp) y oreganito (*Lippia alba*) cultivado en la zona Norte del departamento de Bolívar (Colombia). [Tesis]. Colombia. Universidad José Faustino Sánchez Carrión Facultad de Ingeniería Agraria, Industria Alimentarias y Ambiental; 2014.
19. Condo y Quispe. Efecto anti-tirosinasa de extractos metabólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus síntesis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja). [Tesis]. Perú-Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019
20. Mera Santa Cruz, Ermitanio, Papuico Sanchez Liliana. Actividad Anti-tirosinasa y Efecto Fotoprotector del Extracto Etanólico del Tegumento de dos Variedades de *Phaseolus vulgaris* L. ñuña roja y negra. [Tesis]. Perú-Lima: Universidad Norbert Wiener-Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.
21. Contreras Orellana Deisy. Determinación de capacidad Antioxidante y Fenoles Totales en semillas de *Vitis vinífera* L. “Vid” del valle de Cañete. [Tesis]. Perú-Huacho: Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión; 2019.
22. Rivas Perez Bernarda. Compuesto fenólico y actividad antioxidante en extractos de cuadro especies de orégano. SCIELO.ORG. 2017; 12:40.
23. Arcila-Lozano, C.; Loarca-Piña y Guadalupe, Lecona Uribe y E. Gonzáles. El Orégano: Preparado propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. En Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN), Volumen 43, Número 1.
24. Muñoz Centeno L. Plantas medicinales españolas: *Origanum Vulgare* L. (Lamiaceae) [Internet] 2007 [20 de marzo 2021]. Disponible: <https://revistas.uma.es/index.php/abm/article/view/7343/6848>

25. Mamani Nina R. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano sobre *Escherichia Coli* listeria monocytogenes y salmonella, en el cuy de carne. [Tesis]. Perú -Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2016.
26. Fonnegra Gomez R., Jimenez Ramirez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 2da edición. Universidad de Antioquía 2007. Página 193. 195.
27. Shabani F, Sariri R. Increase of melanogenesis in the presence of fatty acids pharmacologyonline.2010; 1:314-9
28. Solary A. Genética De La Pigmentación Humana. Genética Humana Fundamentos y Aplicaciones en Medicina, 3ra edición Buenos Aires Medica Panamérica S.A 2007 Pagina 456 -458
29. Cordero A. Estructura y funciones de la piel. Dermatología en Medicina Interna 2da edición. Buenos Aires 2007. Página 305-3020.
30. Costin G. Pigmentación de la piel humana: los melanocitos modulan el color de la piel en respuesta al estrés. FASEB J.2007. Página 100-120
31. Medline Plus Información de salud para usted biblioteca nacional de medicina E.E.U.U [internet] 2019 [22 de abril del 2021]. Disponible: <https://medlineplus.gov/spanish/skinpigmentation>.
32. Cabrera Silva S. Lissi Gervaso Radiación Ultravioleta y salud. Radiación. Primera edición. Universidad S. A. Chile 2005. Página 90-100
33. Timberlake k. Química general, organica y biológica. Mexico 2013. Pearson Educación
34. Morales López Noemí, Hernández Galindo Jonatán. Cuantificación de flavonoides y determinación de la actividad antioxidante de las hojas de dos especies de género Piper (*Piper hispidum* y *Piper oradendron*) recolectadas en Samayac. [Tesis]. Guatemala: Universidad San Carlos Guatemala; 2013
35. García Martínez Eva, Fernández Segovia Isabel. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. [Tesis]. España: Universidad Politécnica de Valencia; 2010.
36. Olivera Delgado Liz, Gutierrez Felix Eliana. Evaluación de la actividad antimicrobiana “in vitro” sobre cuatro cepas Atcc y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico al 96% de taraxacum officinale (diente de

- león) y del aceite esencial de *minthostachys spicata* (q'eshua muña). [Tesis]. Perú- Cusco: Universidad Nacional San Antonio Abad de Cusco-Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, 2021
37. Sigma-Aldrich. Kit de detección de inhibidores de tirosinasa (colorimético). USA.05/03/2022.
38. Google Maps. <https://www.google.com/maps/place/Marangani+08258/@-14.3572183> [Internet] [citado 18 de abril de 2024]. Disponible en: https://www.google.com/search?sca_esv=6b1c5e95a3d0b06b&rlz=1C1VDKB_esPE967PE967&q=mapa+satelital+de+marangani&sa=X&ved=2ahUKEwi5q-a47cyFAxXKLRkGHSyo.
39. Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Cooperación Iberoamericana, Santafé de Bogotá, D.C. Colombia. 205-208, 247.
40. Huilca Quispe Laura M. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcolico al 70% de *Senecio Rusby* (tikllaywarmi) frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853. [Tesis]. Perú-Cusco: Universidad de San Antonio Abad del Cusco. Facultad de Ciencias de la Salud – Escuela de Farmacia y Bioquímica; 2020
41. Gutiérrez D, Ortiz C, Mendoza A. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Queretano-2008.
42. Brand Williams, W. ,Cuverlier, Berset, C. Uso de un método de radicales libres, para evaluar la actividad la actividad antioxidante. LWT Ciencia y tecnología de los alimentos. Investigacion científica. 1995
43. Guillen Quispe Yanynee N., Hwan Hwang Seung,Zhiqiang Wang.Deteccion de propiedades inhibitorias de tirosina en plantas peruanas: identificación de inhibidores de tirosina en *Hypericum laricifolium* Juss . [Biblioteca nacional de medicina].4 de marzo de 2017, 22(3): 402. Doi; 10,3390/moléculas 22030402
44. Mendoza Alvarez Shirley C. Evaluación de la actividad coagulante, hemostática y toxicidad aguda por via oral y tópica del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* (miskicha). [Tesis]. Perú-Cusco: Universidad de San

- Antonio Abad del Cusco. Facultad de Ciencias de la Salud – Escuela de Farmacia y Bioquímica; 2019
45. Villar del Fresno A. farmacología general. Ed síntesis- España primera edición. Madrid España 1999.
 46. Lauriano Acosta Arturo, Lizaraso Giles Ysabel. Caracterización y obtención de Preservantes Microencapsulados a partir de Extractos Acuosa de Orégano (*Origanum vulgare*), Chincho (*Tagetes elliptica*) y Acedera (*Rumex crispus*). Universidad San Ignacio de Loyola. Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial y de Agronegocios. Lima 2017.
 47. Riaño Cabrera Néstor. Fundamentos de química analítica básica. Primera edición. Manizales-Colombia: Editorial Universidad de Caldas 2007.
 48. Cordova Lemus Dina Jocabed, Dardon Juarez Roxana. Determinación y cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutracéuticos. [Tesis]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Químicas y Farmacia 2009.
 49. Zambrano Zamora Gilson, Bailón Bermúdez Evelyn. Compuestos fenólicos de orégano (*Origanum vulgare*) y jengibre (*Zingiber officinale*) encapsulado y su efecto en la conservación del queso fresco. Universidad Laica Eloy Alfaro Demanabi. Proyecto de tesis previo a la obtención del Título de ingeniero Agroindustrial. Manta – Ecuador 2018.
 50. Galvez Calla Luis, Alvarez Páucar María. Actividad antioxidante del gel a base de extracto de *Origanum vulgare*. (REH) 2021; 3(1): 39-21

ANEXO

ANEXO N°1

CERTIFICADO DE LA IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- **APARTADO POSTAL**
N° 921 - Cusco - Perú
- **FAX:** 238156 - 238173 - 222512
- **RECTORADO**
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- **CIUDAD UNIVERSITARIA**
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 252226
- **CENTRAL TELEFÓNICA:** 232298 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- **LOCAL CENTRAL**
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- **MUSEO INKA**
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- **CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA**
San Jerónimo s/o Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- **COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"**
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 20-2023-HVC-FCB- UNSAAC

La Directora del Herbario Vargas CUZ, Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: **Karen Del Castillo Ttito**, Bachiller de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la UNSAAC; ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ, una (01) muestra botánica para su determinación taxonómica (expediente N° **526226**), para el proyecto de investigación, "**ACTIVIDAD INHIBITORIA IN VITRO SOBRE LA ENZIMA TIROSINASA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare L.***", la que al ser diagnosticada por el Mgt. Abel Monteagudo Mendoza, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del herbario, concuerdan con las siguientes especies; de acuerdo a la clasificación del Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMUN
1	Lamiaceae	<i>Origanum vulgare L.</i>	"oregano"

Se le expide la presente certificación a petición formal de la interesada para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 14 de abril de 2023

Blga. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas CUZ



ANEXO N°2

FICHA DE RECOLECCION DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

ESPECIE VEGETAL:	
.....	
FECHA Y HORA :...../...../.....;.....	
CARACTERISTICAS	ESPECIFICACIONES
NOMBRE CIENTIFICO:	
NOMBRE COMUN:	
FAMILIA:	
GENERO:	
ESPECIE:	
CARACTERISTICAS:	
DESCRIPCIÓN GENERAL:	
LUGAR DE RECOLECCION:	
<ul style="list-style-type: none"> ○ REGIÓN: ○ PROVINCIA: ○ DISTRITO: 	
ALTITUD:	
LATITUD	
TEMPERATURA:	
NOMBRE QUIEN RECOLECTO:	
PARTES USADAS:	
RAIZ	()
TALLO	()
HOJAS	()
OBSERVACIONES:	
.....	
.....	
.....	

Fuente: elaboración propia

ANEXO N°3

FICHA DE RECOLECIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO PARA LA MARCHA
FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L.
(Orégano)

EVALUACIÓN	DETERMINACIÓN	RESULTADOS
Prueba de Dragendorff	Alcaloides	
Prueba de Bornträger (KOH10%)	Quinonas	
Prueba de Fehling	Azucares reductores	
Prueba de Espuma	Saponinas	
Prueba de Shinoda	Flavonoides	
Prueba de Cloruro Férrico	Polifenoles	
Prueba de Baljet	Lactonas sesquiterpénicos	
Prueba de Liebermann Burchard	Esteroides	

FUENTE: Elaboración propia

Leyenda:

- Abundante: +++
- Poco: ++
- Escaso: +
- Ausente: -

ANEXO N°4

FICHA DE RECOLECIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO PARA LA
SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L.
(Orégano)

DISOLVENTE	RESULTADOS
H2O	
Metanol	
Etanol 40%	
Etanol 70%	
Etanol 96%	
Acetona	
Acetato de Etilo	
Cloroformo	
Benceno	
Hexano	

FUENTE: Elaboración propia

Leyenda:

- Muy Soluble: +++
- Soluble: ++
- Poco Soluble: +
- Insoluble: -

ANEXO N°5

FICHA DE RECOLECIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO PARA LA CAPACIDAD DE FENOLES TOTALES DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L. (Orégano)

PARA LA CURVA DE CALIBRACION

CONCENTRACION ACIDO GALICO ug/mL	ABSORBANCIA 765 nm	PROMEDIO DE LAS LECTURAS
50		
100		
150		

FUENTE: Elaboración propia

PARA EL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L. (Orégano)

MUESTRA	ABSORBANCIA 765 nm	PROMEDIO DE LAS LECTURAS
<i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano)		

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO N°6

FICHA DE RECOLECIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L. (Orégano)

PARA LA CURVA DE CALIBRACION

CONCENTRACION DE TROLOX ug/mL	ABSORBANCIA 517 nm	PROMEDIO DE LAS LECTURAS
25		
75		
125		

FUENTE: Elaboración propia

PARA EL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L. (Orégano)

CONCENTRACION DE EXTRACTO METANÓLICO ug/mL	ABSORBANCIA 517 nm	PROMEDIO DE LAS LECTURAS
31.25		
62.50		
125		
250		
500		

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO N° 7

FICHA DE RECOLECIÓN PARA LA ACTIVIDAD INHIBITORIA IN VITRO DE LA ENZIMA TIROSINASA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L.
(Orégano)

PARA EL PATRON ACIDO KOJICO desde el minuto 0 a 60

Conc. Ácido Kojico	BLANCO	Concentración 0.14 ug/mL	Concentración 0.71 ug/mL	Concentración 0.99 ug/MI
TIEMPO				
0				
10				
20				
30				
40				
50				
60				

FUENTE: Elaboración propia

PARA EL EXTRACTO METANÓLICO DE *Origanum vulgare* L. (Orégano) desde el minuto 0 a 60

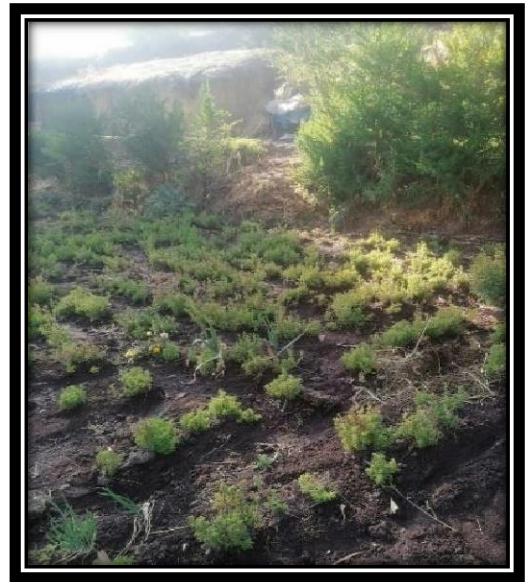
EXTRACTO	BLANCO	MUESTRA A 25 ug/mL	MUESTRA A 50 ug/mL	MUESTRA A 100 ug/mL	MUESTRA A 250 ug/mL	MUESTRA A 500 ug/mL
TIEMPO						
0						
10						
20						
30						
40						
50						
60						

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO N° 8

GALERIA DE FOTOS

PARTE N°1: RECOLECCION DE LA ESPECIE EN ESTUDIO



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°1 Y N°2: Recolección de la planta de *Origanum vulgare* L. (Orégano), en la comunidad de Hancohocca, distrito de Marangani, provincia de Canchis del departamento de Cusco a 3698 m.s.n.m.



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°3: Secado y selección de la especie en estudio: *Origanum vulgare* L. (Orégano)

**PARTE N°2: OBTENCION DEL EXTRACTO SECO METANÓLICO DE
ORIGANUM VULGARE L. (ORÉGANO)**



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°4: Molino de granos para moler la planta seca de *Origanum vulgare* L. (Orégano)



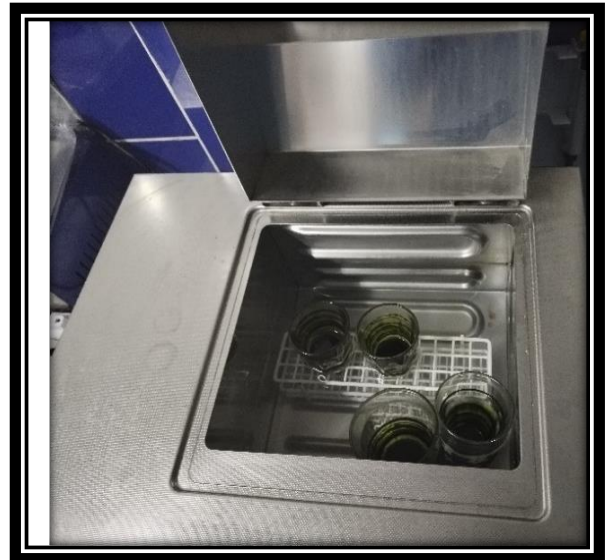
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°5: Muestra pulverizada de la especie vegetal *Origanum vulgare* L. (Orégano)



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°6: Botellas de color ámbar para la maceración de la muestra pulveriza *Origanum vulgare* L. (Orégano) con el solvente de metanol por 15 días.



FUENTE: Elaboración propia

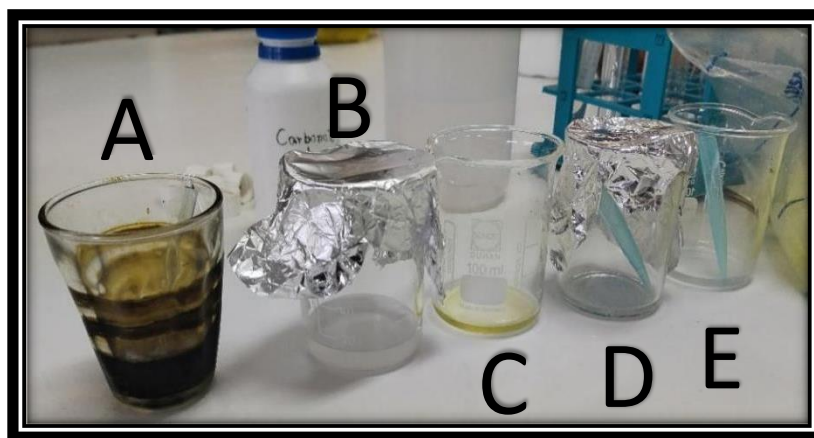
FIGURA N°7 Y N°8: Equipo de baño maria con solución del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) para que la muestra se lleve a sequedad.



FUENTE: Elaboración propia

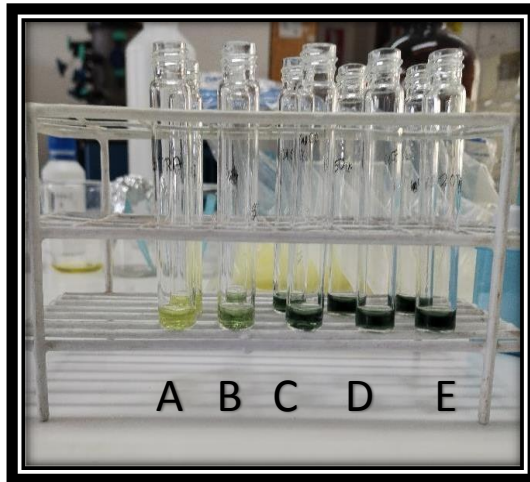
FIGURA N°09: Se observa el extracto metanólico seco de *Origanum vulgare* L. (Orégano) obtenido por baño maria

PARTE N°3: DETERMINACION DE FENOLES TOTALES DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *ORIGANUM VULGARE* L. (ORÉGANO)



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°10: Se observa (A) el extracto del metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) (B) el patrón de ácido galico a una concentración de 1mg/mL, (C) diluciones a una concentración de 50 ug/mL, (D) diluciones a una concentración de 100 ug/mL, (E) diluciones a una concentración de 150 ug/mL, partir del patrón de ácido galico, por el procedimiento de Folin-Ciocalteu.



FUENTE: Elaboración propia

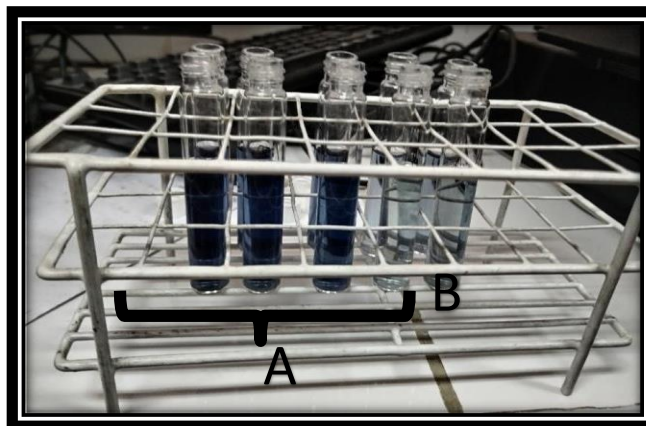
FIGURA N°11: Tubos con diferentes concentraciones del patrón de ácido gálico y la muestra del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano), mas el reactivo de Folin-Ciocalteu. (A) Extracto disuelto en metanol,(B) patron acido galico a una concentracion de 50 ug/mL, (c) patron acido galico a una concentracion de 100 ug/mL, (D) patron acido galico a una concentracion de 150 ug/mL , (E) patron acido galico a una concentracion de 200 ug/mL



FUENTE: Elaboración propia

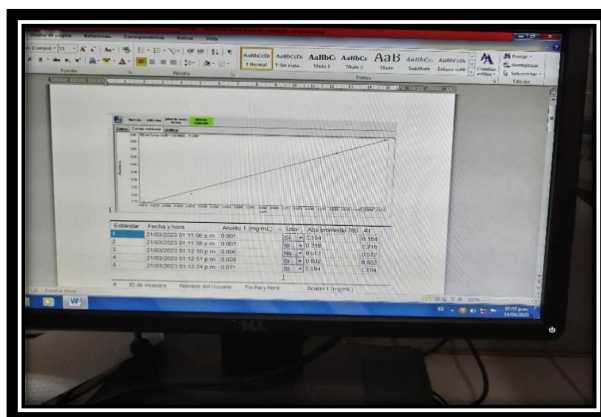
FIGURA N°12: Tubos con diferentes concentraciones del patrón de ácido gálico y la muestra del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano), mas el reactivo de Folin-Ciocalteu, transcurrido el tiempo se agrega agua mas carbonato de sodio al 7.5%. (A) Extracto disuelto en metanol, (B) patron acido galico a una concentracion de 50 ug/mL, (c)

patron acido galico a una concentracion de 100 ug/mL, (D) patron acido galico a una concentracion de 150 ug/mL, (E) patron acido galico a una concentracion de 200 ug/mL



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°13: Después de dos horas los tubos con diferentes concentraciones del patrón de ácido gálico y la muestra del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) cambiaron la tonalidad de color. (A) patron acido galico a diferentes concentracion de 200, 150,100, 50 ug/mL, (B) Extracto demostrando la actividad antioxidante.



FUENTE: Elaboración propia

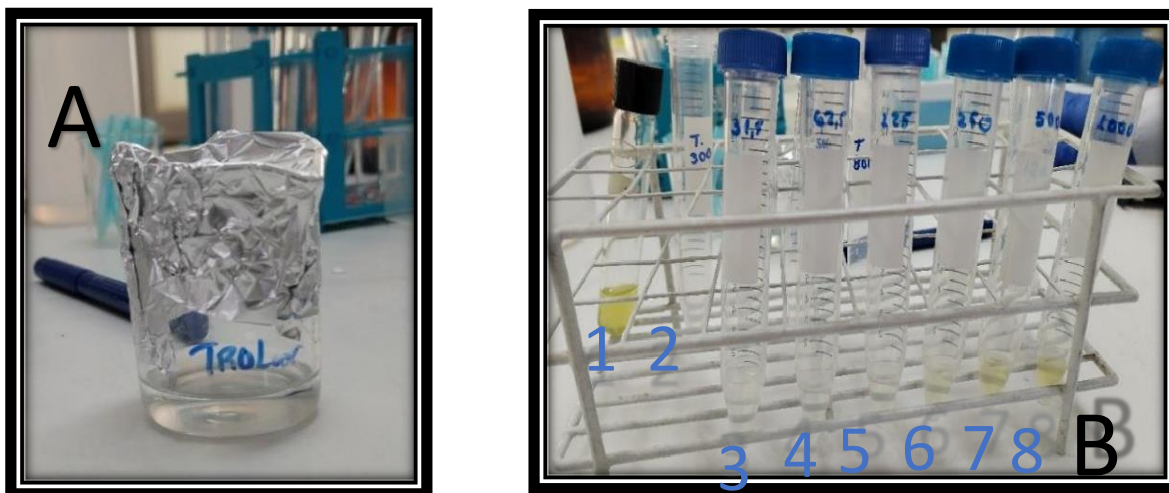
FIGURA N°14: Resultados de las absorbancias en el espectrofotómetro a 765nm, de los tubos con diferentes concentraciones del patrón de ácido gálico y la muestra del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).

**PARTE N°4: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH
DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *ORIGANUM VULGARE* L. (ORÉGANO)**



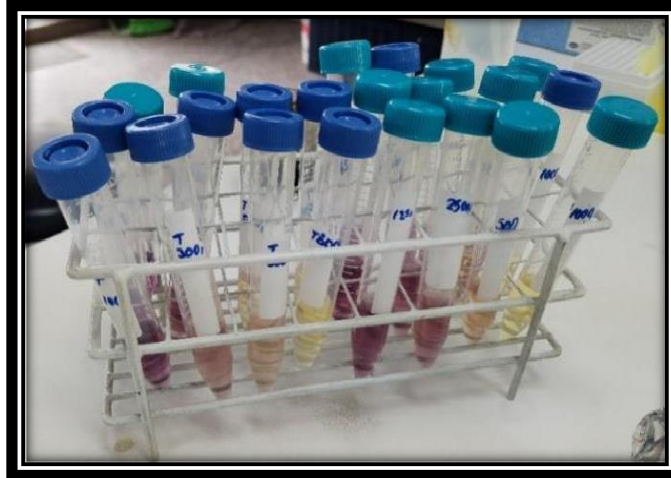
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°15: Se observa (A) el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) disuelto y (B) el reactivo de trolox, (C) el reactivo del radical DPPH, para la capacidad antioxidante usando por la decoloración DPPH.



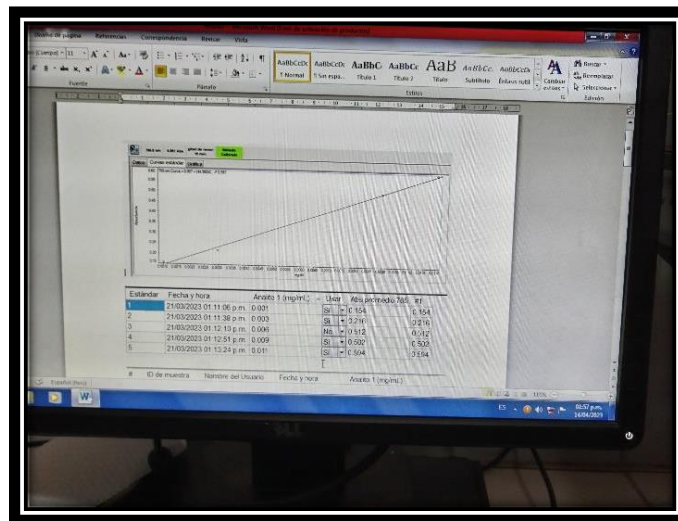
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°16: (A) Preparación del patrón de trolox, (B) se observa los tubos de ensayo con diferentes concentraciones del patrón trolox, radical DPPH y del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano). (1) Extracto disuelto en metanol, (2) patrón trolox a una concentración de 3 mL, (3) patrón trolox a una concentración de 1.875 mL, (4) solución de extracto a una concentración de 62.5 µg/mL, (5) solución de extracto a una concentración de 125 µg/mL, (6) solución de extracto a una concentración de 250 µg/mL, (7) solución de extracto a una concentración de 500 µg/mL, (8) solución de extracto a una concentración de 1000 µg/mL,



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°17: Tubos de ensayo después de una hora de diferentes concentraciones del patrón trolox y del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).



FUENTE: Elaboración propia

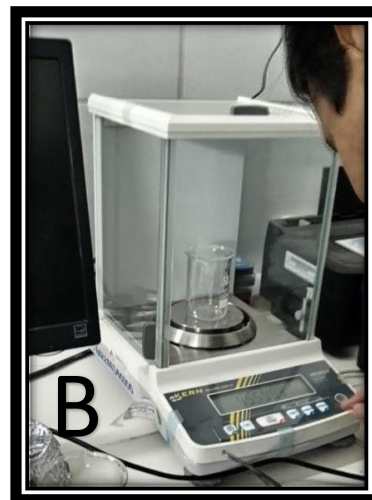
FIGURA N°18: Resultados de las absorbancias en el espectrofotómetro a 517nm del patrón de trolox y las soluciones de DPPH con el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano),

PARTE N°5: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA INVITRO
SOBRE LA ENZIMA TIROSINASA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
ORIGANUM VULGARE L. (ORÉGANO)



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°19, N°20 Y N°21: Se observa el kit de detección de inhibidores de tirosinasa (colorimétrico) para el extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).



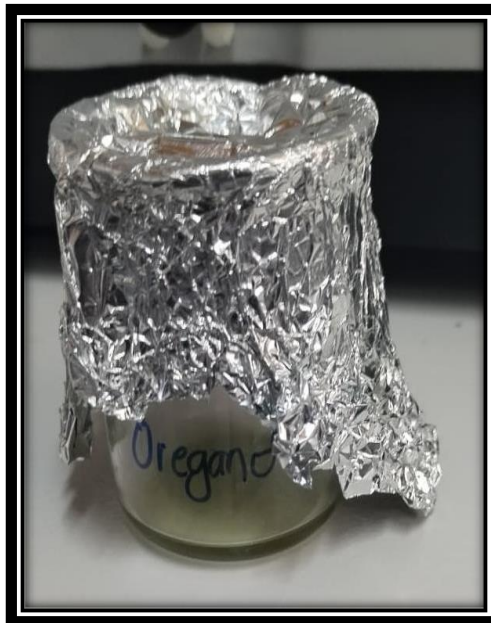
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°22 Y N°23: (A) Preparación del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) y (B) pesado del extracto.



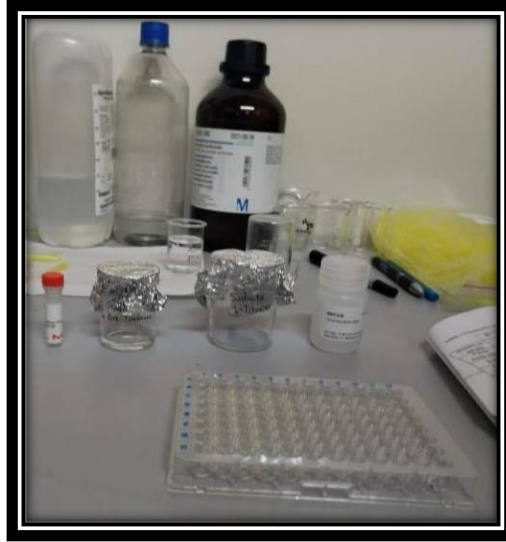
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°24: Equipo de purificación de agua ultra pura para la disolución del kit de detección de inhibidores de tirosinasa.



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°25: El extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) disuelto para preparar las soluciones.



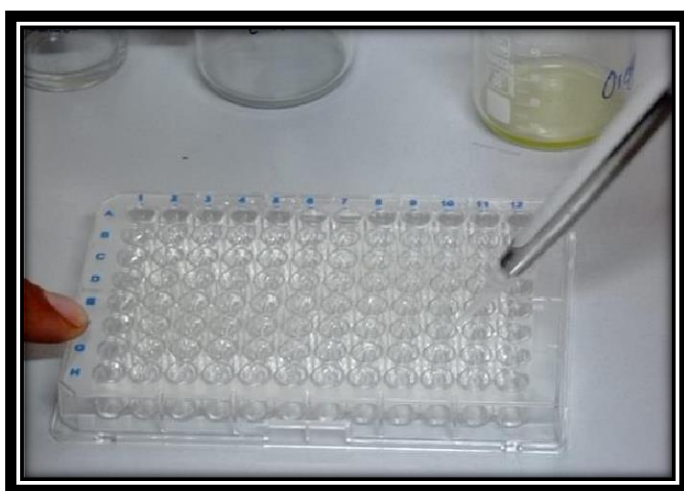
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°26: Preparación del kit de detección de inhibidores de tirosinasa: la enzima tirosinasa, buffer, sustrato de L-tirosinasa, ácido kojico.



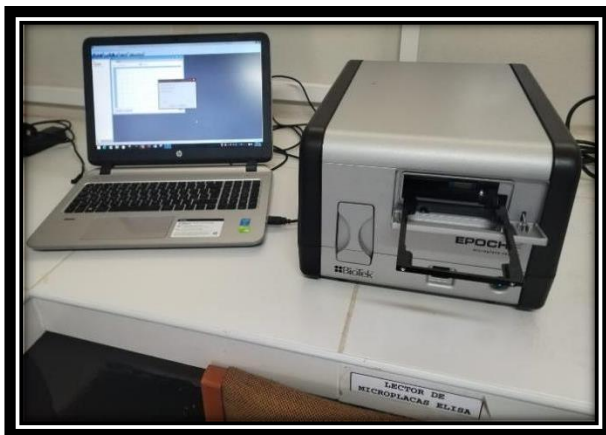
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°27: Preparación del patrón de ácido kojico en las microplacas de Elisa a diferentes concentraciones.



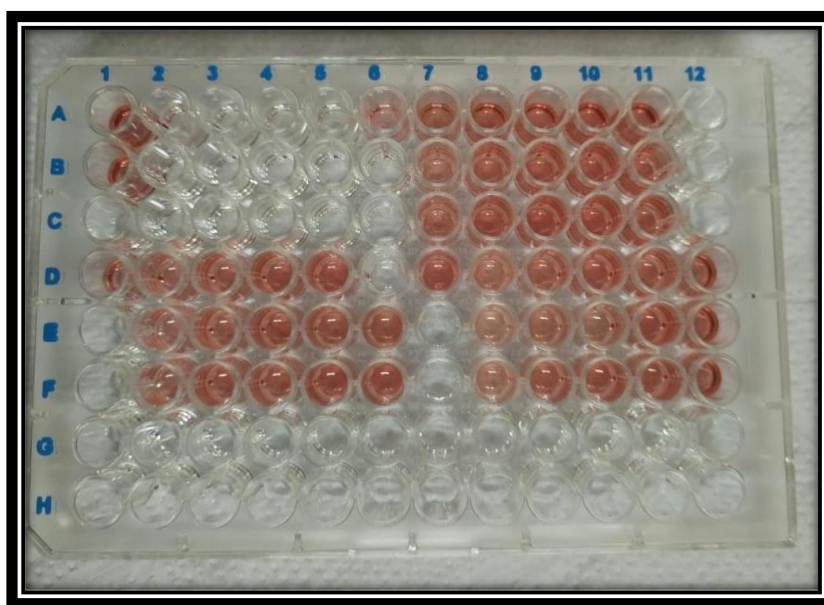
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°28Y N°30: Preparación blanco buffer y del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano) en las microplacas de Elisa a diferentes concentraciones.



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°32: El equipo de lector de microplacas Elisa para la realización de la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°33: Las muestras de patrón de ácido kojico, blanco buffer y del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano), para luego realizar la absorbancia en equipo de microplacas Elisa para los resultados de la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (Orégano).